

UNIVERSITÉ DE MONTRÉAL

**Caractérisation du risque posé par les oocystes infectieux de *Cryptosporidium*  
de sources rurales et urbaines dans les eaux de surface**

CINDY LALANCETTE

DÉPARTEMENT DES GÉNIES CIVIL, GÉOLOGIQUE ET DES MINES  
ÉCOLE POLYTECHNIQUE DE MONTRÉAL

THÈSE PRÉSENTÉE EN VUE DE L'OBTENTION  
DU DIPLÔME DE PHILOSOPHIAE DOCTOR  
(GÉNIE CIVIL)  
JANVIER 2011

© Cindy Lalancette, 2011

UNIVERSITÉ DE MONTRÉAL

ÉCOLE POLYTECHNIQUE DE MONTRÉAL

Cette thèse intitulée:

CARACTÉRISATION DU RISQUE POSÉ PAR LES OOCYSTES INFECTIEUX DE  
*CRYPTOSPORIDIUM* DE SOURCES RURALES ET URBAINES DANS LES EAUX DE  
SURFACE

présentée par: LALANCETTE Cindy

en vue de l'obtention du diplôme de : Philosophiae Doctor

a été dûment acceptée par le jury d'examen constitué de :

M. COMEAU Yves, Ph.D., président

Mme PRÉVOST Michèle, Ph.D., membre et directrice de recherche

M. DESJARDINS Raymond, M. Ing, membre

M. MONETTE Frédéric, Ph.D., membre

## DÉDICACE

*À mon amoureux Przemyslaw(Mike)Sapieha, qui a  
teinté cette grande aventure de ses nombreux  
conseils et de son précieux support*

## REMERCIEMENTS

Toute cette aventure n'aurait d'abord pas eu lieu sans l'accueil chaleureux de ma directrice de thèse, Dr. Michèle Prévost. Telle une maman qui m'a prise sous son aile, elle a su m'amener à développer des outils professionnels et personnels qui me serviront toute ma vie. De bons exemples sont ceux de foncer dans une situation initialement intimidante, de trouver les aspects vendeurs d'un projet ou encore de défendre mes points de vue. Son enthousiasme contagieux, sa grande franchise et son inévitable spontanéité ont souvent su encourager mon parcours doctoral. Merci Michèle, je suis très fière de faire parti de votre (ta) progéniture.

I owe my deepest gratitude also to Dr. Di Giovanni who has made available his enthusiastic support in a number of ways with constant generosity and accessibility. Your persistent encouragement brought me a lot of energy and confidence in my work. Your positive attitude will remain a great example for me for years to come.

J'aimerais aussi chaleureusement remercier Dr. Servais qui, au long de ces années, m'a apporté de nombreux et précieux conseils issus de solides expériences. Merci aussi pour ces soirées partagées un peu partout en Amérique du Nord!

Professeur accompli qui trouve le temps de faire beaucoup de vélo, Dr. Comeau, comment ne pas trouver un model en vous? Je dois avouer que je répète souvent à mon conjoint : je veux toujours continuer à me déplacer en vélo comme Dr. Comeau!! Merci de présider cette dernière et imposante étape de ma vie étudiante.

Grand merci à M. Desjardins de siéger sur mon comité de thèse. Je ne vous connais pas beaucoup professionnellement mais vous avez définitivement teinté ces années de belles et inspirantes histoires, racontées avec vos grands talents de professeur.

Dr. Monette, je tiens à vous remercier de prendre part à mon comité de thèse et j'ai bien hâte de vous rencontrer pour ainsi, mieux vous connaître.

La première personne que j'ai rencontrée à Polytechnique est nul autre que Dr. Barbeau, Benoit de son prénom. Merci pour tes conseils tout au long de mon parcours qui m'ont aidée à porter un regard différent sur mon projet. Merci pour ta force tranquille et ton grand enthousiasme envers Benoit jr et Michèle jr.!

La plus grande source d'inspiration, depuis les 11 dernières années, qui m'a menée jusqu'ici provient sans aucun doute mon amoureux. Merci Mike d'avoir cru en moi, de m'avoir encouragée à faire d'abord un baccalauréat pour ensuite continuer aux études graduées. Merci pour ta grande franchise, ton support incroyable, tes nombreux conseils et merci d'avoir été et d'être toujours un modèle professionnel à suivre. Merci aux deux p'tits nouveaux qui se pointeront les bouts de nez quelque part dans le prochain mois : vous avez gentiment laissé Maman finir l'école. Grand merci à ma mère, mon père et mon frère qui m'ont toujours supporté avec fierté dans cet univers académique. Vous m'avez toujours souhaité d'être heureuse dans ce que j'entreprends, même si cela m'a menée loin de la maison et je vous en suis très reconnaissante. Merci à ma belle-famille, pour m'avoir donné l'exemple de la voix académique ainsi que de nombreux conseils dans ce monde qui m'était initialement inconnu.

Grand merci à ces personnes que j'ai rencontrées au cours de mon parcours à Polytechnique et que j'ai aujourd'hui l'immense privilège de compter parmi mes amis. D'abord, Isabelle qui fut à ma gauche pendant toutes ces années : que vais-je faire maintenant? Qui va m'écouter et me conseiller dans les courbes de la vie? Je vais devoir te kidnapper régulièrement. Merci à Frankie (Françoise) l'artiste-scientifique remplie de grands talents et Miss Bicky (Françoise) la sensible qui pense toujours aux autres avant elle-même : excellent modèle de compréhension et de générosité! Merci à Magic (Majdala) pour sa grande bonté pimentée d'une vive énergie qui se rapproche plus de celle d'un super héros que celle d'un simple humain. Je souhaite très sincèrement pouvoir être à la hauteur de ce que vous avez été pour moi et de garder un quotidien avec vous dans les nouveaux chapitres que nous entreprendrons.

Merci à Maestro (Ana) pour son sens aigu du partage entre les choses sérieuses et moins sérieuses de la vie, à Caribou (Murielle) pour sa belle générosité, sa grande sensibilité et pour sa ténacité qui est source d'inspiration. Merci à Arash Le Grand et Petit Frère, Pierre Le Gentil,

Renée L'Ouverte, Marie-France La Fonceuse, Guillaume Le Jeune, Daniel Le Sage, Gabriel L'Optimiste. Merci pour vos précieuses présences passées, présentes et futures!

Immense merci à Jacinthe pour son excellente présence professionnelle ainsi que personnelle. Ta force, tes conseils et ton support m'ont permis de traverser les dernières années avec plus de confiance : j'espère pouvoir entretenir cette complicité dans les temps à venir. Merci à France, pour tout ton aide et support ainsi que pour les éclats de rire au 4<sup>ième</sup>. Merci à Mélanie et Mireille, pour votre excellente aide technique, toujours très professionnelles et intéressées. Merci à Julie, Yves, Shokoufeh, Annie, Marcellin et Marie-Claude.

Poopoo (Anne-Sophie) : merci pour ta belle solidarité dans ce monde d'eau potable, merci à Little Tiger (Gabrielle), à La Douce Céline, à Papa Clément, à Élise La Pâtissière, ainsi qu'à tous les "nouveaux" que je connais moins mais qui gagnent très certainement à être connus!

Merci aux personnes qui ont collaboré sur ce projet : Mylène Généreux, Caroline Côté ainsi que Aubert Michaud de l'Institut de Recherche en Agro-Environnement, vous m'avez grandement aidé à apprivoiser le monde mystérieux de l'agriculture. Merci aux fermiers, aux traiteurs d'eau potable ainsi qu'aux épurateurs d'eaux usées pour nous avoir généreusement permis d'accéder à leurs installations... alors que nous y cherchions des parasites!

Merci à mon fidèle Apachee, qui est allé me promener régulièrement afin que je sorte un peu dehors ainsi qu'à Lobsang et Zanskar qui ont dormi très très très confortablement près de moi pendant mes journées d'écriture.

Finalement, je tiens à remercier les partenaires industriels : les villes de Montréal et Laval et John Meunier inc. ainsi que le CRSNG pour leur intérêt et leur soutien en la recherche et la formation.

## RÉSUMÉ

Depuis les deux dernières décennies, *Cryptosporidium* a été l'agent infectieux le plus fréquemment associé aux éclosons reliées à l'eau potable aux États-Unis (Craun *et al.*, 2006) et en Angleterre et Wales (Smith *et al.*, 2006) et aussi identifié comme responsable de 23.7% des éclosons de protozoaires dans le monde (Karanis *et al.*, 2007). Ces oocystes ont ainsi rapidement attiré l'attention des autorités de santé publique et leur persistance dans l'environnement, leur résistance aux désinfectants conventionnels et leur haut taux d'infectivité (WHO, 2006) ont par la suite fait de lui la cible à toucher lors de l'élaboration de stratégies de traitement d'eau potable (Ministère du Développement Durable de l'Environnement et des Parcs (MDDEP), 2006; USEPA, 1998a, 2006a).

Aux États-Unis, l'estimation des oocystes totaux retrouvés dans les eaux de surface dicte les niveaux d'enlèvement et de désinfection aux traiteurs d'eaux. Les coûts additionnels attribués aux ajustements de traitement ont été estimés entre 92 à 133 million de dollars par années (USEPA, 2005a). L'étude économique d'où découlent ces mises à niveaux utilise les comptes totaux d'oocystes, corrigés par une fraction infectieuse approximative et élevée. Ces comptes totaux corrigés ne tiennent pas adéquatement compte de la grande diversité des espèces de *Cryptosporidium*, dont seules quelques unes infectent l'humain (Xiao *et al.*, 2004), ni de leur survie dans l'environnement (King and Monis, 2007). Afin de permettre une évaluation plus juste du risque que posent les oocystes de *Cryptosporidium* à l'humain, l'infectivité des oocystes trouvés dans l'environnement demeure le paramètre critique à préciser. Ainsi, les industriels pourront élaborer des stratégies de traitement plus juste pour qu'ultimement, de meilleurs investissements soient faits en santé publique.

L'objectif général des présents travaux de recherche consiste à caractériser le risque sanitaire associé aux oocystes infectieux de *Cryptosporidium* dans les eaux de surfaces influencées par des sources de pollution urbaines et agricoles. Pour y arriver, trois principaux volets ont été développés :

- Développement et optimisation d'une méthode de détection des oocystes infectieux en culture cellulaire en combinant les comptes totaux et infectieux sur un même échantillon;
- Quantification des concentrations totales et des fractions infectieuses de *Cryptosporidium* dans des sources de pollution fécale rurales et urbaines;
- Modélisation des charges d'oocystes totaux et infectieux de *Cryptosporidium* produites par des sources humaines et animales de contamination fécale.

La première étape a consisté à se munir d'une méthode pouvant évaluer la fraction infectieuse des oocystes adéquatement. Les méthodes *in vitro* d'inoculation des oocystes sur des cellules humaines en culture (CC) ont rapidement été sélectionnées pour leur capacité à reproduire les modèles *in vivo* (Rochelle *et al.*, 2002; Slifko *et al.*, 2002). Parmi ces méthodes, trois types de détection des foyers infectieux sur les cellules en culture ont été antérieurement développés : l'immunodétection (CC-IFA), la détection d'ADN (CC-PCR) et la détection d'ARN (CC-RT-PCR). La comparaison de ses trois modes de détections a été réalisée par Johnson *et al* (2010) et ils ont conclu que l'immunodétection offrait les meilleures performances. Cependant, comme les protocoles de CC-IFA présents dans la littérature manquaient d'uniformité, une première étape a consisté à comparer et à optimiser les différents milieux de stimulation et d'infection des oocystes sous un rationnel physiologique. Dans l'optique de favoriser le développement de foyers infectieux, plusieurs niveaux de pH, différentes protéases et autres composés gastro-entériques ont été testés. Les résultats ont démontré que, pour le milieu de stimulation, un simple traitement acide suffit. Pour le milieu d'infection, une concentration ajustée à 50 mM D-glucose améliore le compte de foyer mais à 300 mM, il l'inhibe. La deuxième étape du développement a permis d'améliorer de façon majeure les méthodes de détection des foyers infectieux en y combinant la détection du compte total d'oocystes. Ainsi, d'un seul échantillon analysé par la même méthode, les comptes d'oocystes totaux et de foyers infectieux ont pu être obtenus. Ce combiné a permis de calculer la fraction infectieuse directement, ce qui permet de diminuer les biais des estimations précédentes. En effet, elles consistaient à utiliser des réponses découlant d'échantillons de faibles concentrations d'oocystes et provenant de matrices hétérogènes selon des analyses indépendantes. La nouvelle Détection Double et Directe sur Culture Cellulaire Analysée par ImmunoFluorescence (3D-CC-IFA) offre de plus des taux de récupération comparables aux



méthodologies standardisées et un pourcentage infectieux stables au travers de plusieurs types de matrices environnementales.

Équipé de la 3D-CC-IFA, une campagne d'échantillonnage a été lancée à la quête des fractions infectieuses des oocystes de *Cryptosporidium* retrouvées dans les eaux de surface. Comme les oocystes infectieux correspondent à un sous-ensemble des oocystes totaux, de par leurs espèces et leur survie, et que les eaux de surfaces québécoises contiennent de faibles concentrations d'oocystes, l'échantillonnage à leur source s'est imposé. Les points échantillonnés ont donc été sélectionnés selon leur potentiel à contenir des oocystes infectieux pour l'humain. Aussi, les comptes totaux et viables des kystes de *Giardia* ont été réalisés via la méthode 1623 standardisée par le US EPA (USEPA, 2005b). C'est ainsi que deux catégories de pollution fécale ont été départagées : celle provenant du milieu urbain et celle provenant du milieu rural. Pour le milieu urbain, les stations d'épuration des eaux usées (STEP) ont été ciblées comme principales sources. Deux STEP ont été sélectionnées pour leur traitement de niveau secondaire, l'absence de désinfection et leur contenu principalement municipal. Un total de 19 échantillons d'affluents et de 18 échantillons d'effluents ont fait l'objet d'analyses. Les concentrations les plus élevées retrouvées aux affluents ont été de 533 oocystes L<sup>-1</sup> and 9 010 kystes L<sup>-1</sup> et aux effluents de 89 oocystes L<sup>-1</sup> et de 472 kystes L<sup>-1</sup>. Les fractions infectieuses ont varié de sous la limite de détection à 22% pour les affluents et de sous la limite de détection à 7% pour les effluents, mise à part une exception. Ensuite, pour le milieu rural, les fermes de production laitière ont été choisies car les veaux sont les animaux d'élevage principalement infectés par le zoonotique *C. parvum* (Santin *et al.*, 2004). Le petit bassin-versant du ruisseau au Castor (Montréal) est composé presque d'exclusivement de ce type de production. Sept fermes ont été visitées et un total de 20 échantillons composites de fèces fraîches de veau et de 21 de vache ont été analysés, ainsi que 10 échantillons de fumiers et de 10 échantillons d'eau prélevés à l'exutoire du bassin-versant. Pour les deux parasites, les concentrations totales médianes ont été plus élevées chez les veaux (333 oocystes g<sup>-1</sup>; 111 kystes g<sup>-1</sup>) que chez les vaches (52 oocystes g<sup>-1</sup>; 7 kystes g<sup>-1</sup>). Les prévalences des échantillons infectieux trouvées chez les bêtes ont été de 17% chez les veaux et 7% chez les vaches. À l'exutoire, les concentrations totales médianes mesurées ont été de 177 oocystes 100 L<sup>-1</sup> et de 32 kystes 100 L<sup>-1</sup>. Aucun oocyste infectieux n'a été détecté à l'exutoire.

Réaliser des mesures de routine d'oocystes dans les eaux brutes de stations de traitement d'eau potable demeure un constant défi. En effet, même la méthode 1623 de compte total, standardisée par le US EPA (USEPA, 2005b), reste hors de portée pour la plupart des laboratoires de station. De ce fait, la plupart des traiteurs d'eau utilisent une série d'indicateurs de contamination fécale afin de comprendre les variations de la qualité microbiologique des eaux de surface et, par le fait même, la présence du résistant *Cryptosporidium*. Ces indicateurs offrent classiquement peu de corrélations avec les oocystes mais demeurent une solution pratique et abordable. Parallèlement à la campagne d'échantillonnage des parasites précédemment décrite, la turbidité, les matières en suspension (MES), *E. coli*, les coliformes totaux et les streptocoques ont été analysés dans les matrices d'eaux usées ainsi qu'à l'exutoire. Les comparaisons entre la présence, la concentration, le transport rural, l'enlèvement dans les STEP et la survie des oocystes et des kystes avec les indicateurs ont été tentées. D'abord, les résultats des enlèvements des parasites dans les STEP (<1.5 log) se sont révélés inférieurs que ceux observés pour la turbidité (1-1.2 log) et les indicateurs (1.8-2.8 log). Ensuite, en milieu rural, les précipitations cumulées font moins varier les charges que les concentrations observées. Finalement, le peu de relations observées entre les parasites et les indicateurs dans les différentes sources sont en lien avec la littérature et démontrent les limites de leur usage. Des modèles de charges quotidiennes d'oocystes totaux et infectieux émises par des humains et par des animaux ont par la suite été élaborés via une approche Monte-Carlo. Leur utilisation pourrait aller de paire avec celle des indicateurs dans l'optique de solutions simples et peu coûteuses afin de mieux comprendre la présence des oocystes dans les eaux de surface et aussi de nuancer leur risque selon leur fraction infectieuse.

En conclusion, les résultats des travaux réalisés offrent des modèles exposant des ordres de grandeur nuancés et inférieurs aux estimés précédents des fractions infectieuses pouvant se retrouver dans les principales sources de pollution fécale rurales et urbaines. Ceci laisse présager une révision à la baisse du risque initialement estimé de *Cryptosporidium*. Au Québec, la source principale d'oocyste infectieux entrant dans les eaux de surface sont les effluents des STEP et les CSO. Les principales recommandations seraient d'étudier plus profondément les techniques d'abattement ou de désinfection qui offriraient un meilleur contrôle de la qualité microbiologique des rejets d'eaux usées. Comme *Cryptosporidium* est déjà reconnu comme le microorganisme

cible en production d'eau potable, il pourrait offrir ces services pour le traitement des eaux usées via la nouvelle 3D-CC-IFA.

## ABSTRACT

For the last two decades, *Cryptosporidium* has been the most frequently identified etiological agent responsible for drinking water outbreaks in the U.S. (Craun *et al.*, 2006) and England and Wales (Smith *et al.*, 2006) and has been responsible for 23.7% of protozoan outbreaks worldwide (Karanis *et al.*, 2007). Given these alarming statistics, *Cryptosporidium* oocysts quickly attracted the attention of health authorities. Their persistence in the environment, their resistance to disinfection and their high infectivity rates (WHO, 2006) made *Cryptosporidium* oocysts one of the main targets when developing water treatment strategies (MDDEP, 2006; USEPA, 1998a, 2006b).

In the United States, the total *Cryptosporidium* oocysts counts from surface water are used as the main parameter to determine the stringency of microbial removal and disinfection for drinking water suppliers. The increasing costs attributed to these new requirements have been estimated to range from 92 to 133 million dollars per year (USEPA, 2005a). The study that lead to these upgrades overestimated the infectious fraction as it was based on the less relevant number of total counts of oocysts and not the actual number of infectious oocysts. Even when corrected for infectivity, these total counts do not reflect the real treat of this pathogen in light of the limited subset of *Cryptosporidium* species that infect humans (Xiao and Ryan, 2004) and their limited survival in natural environments (King and Monis, 2007). To draw a more accurate assessment of the risk posed by *Cryptosporidium* oocysts to human health, the infectious fractions of environmental oocysts must be determined. Water suppliers can then develop better treatment strategies which will ultimately lead to wiser investments in public health.

The main objective of this thesis is to characterize the risk associated with infectious *Cryptosporidium* oocysts found in surface waters affected by sources of urban and agricultural pollution. To achieve this, we have developed three main components:

- Optimization and development of a method detecting infectious oocysts fractions in cell culture by combining total and infectious counts in the same sample;

- Quantification of total oocysts counts and their infectious fractions in rural and urban fecal pollution sources;
- Modelling total and infectious mass loads of oocysts originating from human and animal fecal contaminations.

The first chapter consisted in selecting a method to properly evaluate oocyst infectivity. *In vitro* methods that inoculate oocysts on human cell culture (CC) were chosen given their relative proximity to *in vivo* models (Rochelle *et al.*, 2002; Slifko *et al.*, 2002). Among these methods, three types of infectious foci detection have previously been developed: immunodetection (CC-IFA), DNA detection (CC-PCR) and RNA detection (RT-CC-PCR). Johnson *et al* (2010) compared these methods and selected the immunodetection as it offers better performances. However, the CC-IFA protocols found in the literature were not homogeneous. Our first step was to compare and optimize various stimulation and infection media within a physiological rational. To favour higher foci counts, several pH levels, different proteases and various gastrointestinal compounds were tested. Our results concluded that a simple acid treatment would yield the optimal stimulation media. For infection media, concentrations adjusted to 50 mM D-glucose promoted infectivity whereas higher levels (300 mM) were inhibitory. The second step consisted in introducing major improvements to the detection of infectious oocyst fractions as it combined total and infectious counts into a single method performed on the same sample. This improved approach allowed for the direct detection of infectious fractions thus reducing the bias of previous methodologies that used independent methods for low and heterogeneous concentrations of environmental *Cryptosporidium* oocysts. Moreover, the new Dual and Direct Detection of Cell Culture with Immunofluorescence Assay (3D-CC-IFA) presents recovery rates comparable to standard methodologies and offers stable percentages of infectivity through spike experiments done in several environmental matrices.

Equipped with the 3D-CC-IFA, a sampling campaign was launched to search for infectious fractions of *Cryptosporidium* oocysts in surface waters. Quebec surface waters contain low oocysts concentrations and infectious oocysts represent a subset of total oocysts. Sampling at their very source was required to capture higher oocysts concentration. Sampling points were

therefore selected based on their potential to contain human infectious oocysts. In addition, total and viable counts of *Giardia* cysts were performed using USEPA Method 1623 (USEPA, 2005b) as they are also a target micro-organism in drinking water treatment. Urban and rural categories of fecal pollution were recognized. For urban areas, wastewater treatment plants (WWTP) were picked out. Two plants were selected for secondary-level treatment, for the absence of disinfection step and for their municipal contents. A total of 19 influent and 18 effluent samples were analyzed. Higher concentrations were found in influents (533 oocysts L<sup>-1</sup> and 9010 cysts L<sup>-1</sup>) than in effluents (89 oocysts L<sup>-1</sup> and 472 cysts L<sup>-1</sup>). Infectious fractions ranged from below the detection limit to 22% for influents and from the detection limit to 7% for effluents.

To obtain samples from rural environment, dairy farms were chosen because calves are the main farm animals infected by the zoonotic *C. parvum* (Santin *et al.*, 2004). In this respect, the small watershed of the Ruisseau au Castor (Montréal) was chosen as it is mainly occupied by dairy productions. Seven farms were visited and sampled for a total of 20 composite samples of fresh calf feces, 21 of cows feces, 10 samples of manure and 10 water samples collected at the watershed discharge. For both parasites, median concentrations were higher in calves (333 oocysts g<sup>-1</sup>, 111 cysts g<sup>-1</sup>) than in cows (52 oocysts g<sup>-1</sup>, 7 cysts g<sup>-1</sup>). The prevalences of infectious oocysts found in cattle were 17% in calves and 7% in cows. Median concentrations were measured being 177 oocysts 100 L<sup>-1</sup> and 32 cysts 100 L<sup>-1</sup> at the watershed discharge and no infectious oocysts were detected.

Routine measurements of oocysts found in surface water remain a constant challenge for water suppliers. Even the US EPA method 1623 stays out of reach for most plant laboratories. As a result, most facilities employ a series of fecal indicators in order to understand changes in microbial quality of surface waters and, by extension, the presence of the resistant *Cryptosporidium*. These indicators typically offer poor correlations with oocysts but remain convenient and inexpensive. Along with our parasite sampling, turbidity, total suspended solid (TSS), *E. coli*, total coliforms and *Streptococcus* were analyzed in wastewater influents and effluents as well as in the rural watershed discharge. The presence, concentration, rural transport, removal in WWTP and survival of oocysts and cysts was compared to indicators. First, the results of parasites removals in WWTP (<1.5 log) were lower than those observed for turbidity (1-1.2

log) and indicators (1.8-2.8 log). Furthermore, in rural areas, oocyst loads vary less than oocyst concentrations relative to cumulative rainfall, suggesting concentrations being biased by dilutions, but not loadings. Finally, hardly any relationship was deduced between parasites and indicators in different sources, in agreement with the literature. These data demonstrate the limits of the techniques. Daily load models of total and infectious oocysts per human and animal equivalents have been developed using a Monte Carlo approach. In the context of finding simple and inexpensive solutions, pairing indicators results with mass load models may offer a better understanding of the presence of oocysts in surface waters and will help to better understand their risk with respect to their infectious fraction.

Overall, this thesis provides the models permitting for the accurate detection of infectious *Cryptosporidium* from rural and urban sources. The data presented suggests a re-evaluation of the inherent risk associated with this pathogen as infectious *Cryptosporidium* oocyst fractions are found at lower levels than previously estimated. Because in Quebec the major sources of infectious oocysts entering our surface water are WWTP effluents, the main recommendations of this doctoral work are to explore wastewater treatment strategies and to improve their microbiological quality. *Cryptosporidium* is already widely recognized as a target microorganism in drinking water treatment and the work presented in this thesis could be beneficial in designing more efficient and cost-effective strategies for wastewater treatment using the new 3D-CC-IFA.

# TABLE DES MATIÈRES

DÉDICACE.....	III
REMERCIEMENTS .....	IV
RÉSUMÉ.....	VII
ABSTRACT .....	XII
TABLE DES MATIÈRES .....	III
LISTE DES TABLEAUX.....	VIII
LISTE DES FIGURES.....	IX
LISTE DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS .....	XII
AVANT-PROPOS .....	1
CHAPITRE 1. INTRODUCTION.....	3
1.1 Mise en contexte.....	3
1.2 Structure de la thèse .....	6
CHAPITRE 2. REVUE DE LA LITTÉRATURE.....	7
2.1 <i>Cryptosporidium</i> : une célébrité en potabilisation des eaux .....	7
2.1.1 Biologie générale.....	7
2.1.2 Épidémiologie .....	10
2.1.3 Barrières et contrôles limitant l'exposition à l'humain .....	12
2.2 Méthodes de détection.....	19
2.2.1 Concentration et isolation d'échantillons environnementaux .....	19
2.2.2 Méthodes de dénombrement : un choix selon l'objectif .....	21
2.3 Occurrence des oocystes de <i>Cryptosporidium</i> .....	28
2.3.1 Milieu forestier.....	28
2.3.2 Milieu urbain .....	31
2.3.3 Milieu rural.....	32
2.3.4 Eaux de surfaces en milieux mixtes .....	33
2.3.5 Eaux traitées pour la consommation .....	33
2.4 Indicateurs et <i>Cryptosporidium</i> .....	33
2.4.1 En milieu urbain .....	34
2.4.2 En milieu rural.....	34



2.4.3	En eaux de surface.....	35
2.5	Revue critique de la littérature .....	36
2.5.1	Méthodes disponibles pour évaluer le risque des oocystes de <i>Cryptosporidium</i> .....	36
2.5.2	Données environnementales disponibles sur la nature infectieuse des oocystes de <i>Cryptosporidium</i> .....	38
2.5.3	Outils prédictifs de la présence des oocystes totaux et infectieux dans les eaux de surface .....	38
CHAPITRE 3. OBJECTIFS DE RECHERCHE ET DÉMARCHE EXPÉRIMENTALE .....		40
3.1	Objectifs de recherche .....	40
3.1.1	Objectif général .....	40
3.2	Hypothèses de recherche .....	42
3.2.1	Hypothèse générale .....	42
3.3	Méthodologie .....	43
3.3.1	Développement méthodologique.....	43
3.3.2	Campagne d'échantillonnage .....	45
3.3.3	Outils prédictifs : indicateurs et modèle de charge .....	47
CHAPITRE 4. PUBLICATION #1: IMPROVED RISK ANALYSIS BY DUAL DIRECT DETECTION OF TOTAL AND INFECTIOUS CRYPTOSPORIDIUM OOCYSTS ON CELL CULTURE IN COMBINATION WITH IMMUNOFLUORESCENCE ASSAY .....		48
4.1	Abstract .....	49
4.2	Introduction .....	49
4.3	Materials and method .....	59
4.3.1	Source of <i>Cryptosporidium</i> oocysts .....	59
4.3.2	Cell culture .....	59
4.3.3	Oocyst stimulation pretreatment .....	59
4.3.4	Infection of cell monolayers.....	59
4.3.5	Detection of infection.....	60
4.3.6	Filtration count of oocysts.....	60
4.3.7	Excystation rate of stimulated oocysts .....	61

4.3.8	Effect of the proportion of UV-killed oocysts on cell culture infectivity and oocyst retention on monolayers .....	61
4.3.9	3D-CC-IFA method recovery.....	61
4.3.10	Spiked environmental assay for recovery study from IMS purification .....	62
4.3.11	Direct and indirect calculations of the percentage of infectious oocysts from the CC-IFA.....	62
4.4	Results .....	62
4.4.1	Reference counts .....	62
4.4.2	Stimulation pretreatment .....	63
4.4.3	Addition of bile to stimulation and infection media .....	65
4.4.4	Optimization of infection media .....	66
4.4.5	Dual detection : sources of oocyst loss during sample processing .....	67
4.4.6	Dual detection: what could influence oocyst adhesion to the cell monolayer? .....	68
4.4.7	Selection of antibodies .....	70
4.4.8	3D-CC-IFA recovery studies .....	70
4.5	Discussion .....	72
4.5.1	Impact of media selection on pretreatment .....	72
4.5.2	Addition of bile to the stimulation and infectious media .....	72
4.5.3	Impact of media selection on infection .....	73
4.5.4	Oocyst loss in dual detection.....	73
4.5.5	Factors affecting oocyst adhesion to the cell monolayer .....	74
4.5.6	Selection of antibodies for immunodetection in dual detection .....	74
4.5.7	Benefits of the 3D-CC-IFA direct count method .....	75
4.5.8	Recoveries of the 3D-CC-IFA in natural and MilliQ waters .....	76
4.5.9	3D-CC-IFA, for various <i>Cryptosporidium</i> species .....	77
4.6	Conclusion.....	78
4.7	Acknowledgments .....	78
CHAPITRE 5. PUBLICATION #2: TOTAL AND INFECTIOUS <i>CRYPTOSPORIDIUM</i> OOCYST AND <i>GIARDIA</i> CYST CONCENTRATIONS FROM DISTINCT URBAN AND RURAL CONTAMINATION SOURCES .....		79

5.1	Abstract .....	80
5.2	Introduction .....	80
5.3	Materials and Methods .....	82
5.3.1	Description of sampling sites .....	82
5.3.2	Sample preparation prior to IMS separation for <i>Cryptosporidium</i> and <i>Giardia</i> analysis .....	83
5.3.3	Immunomagnetic separation (IMS) .....	84
5.3.4	Dual direct detection on a cell culture with immunofluorescence assay (3D-CC-IFA).....	85
5.3.5	Total <i>Giardia</i> counts .....	85
5.4	Results .....	85
5.4.1	Recovery and Infectivity controls .....	85
5.4.2	(Oo)cysts from urban sources .....	87
5.4.3	(Oo)cysts from rural sources .....	89
5.5	Discussion .....	91
5.5.1	Urban matrix total (oo)cysts recovery and <i>Cryptosporidium</i> infectivity controls .....	91
5.5.2	Rural matrix total (oo)cysts recovery and <i>Cryptosporidium</i> infectivity controls .....	93
5.5.3	(Oo)cysts from urban sources .....	94
5.5.4	(Oo)cysts from rural sources .....	96
5.6	Conclusions .....	100
5.7	Acknowledgments .....	101
CHAPITRE 6. PUBLICATION #3: CONCENTRATIONS AND MASS LOADINGS OF TOTAL AND INFECTIOUS <i>CRYPTOSPORIDIUM</i> OOCYSTS IN URBAN AND RURAL SOURCES.....		102
6.1	Abstract .....	103
6.2	Introduction .....	103
6.3	Material and Method .....	109
6.3.1	Description of the urban WWTP.....	109
6.3.2	Description of rural sub watershed.....	110
6.3.3	Microbiological and indicator methods.....	111

6.3.4	Ratio and point daily load estimates .....	112
6.3.5	Mass load models .....	112
6.4	Results and discussion.....	112
6.4.1	Turbidity, microbial indicators and <i>Cryptosporidium</i> removals in WWTP.....	112
6.4.2	Temporal variations of concentrations of <i>Cryptosporidium</i> and of microbial and environmental indicators in the discharge stream .....	115
6.4.3	Load modelling may be an improvement leading to person/animal equivalents .....	119
6.4.4	Urban model: WWTP effluent contribution to oocysts loadings to surface water ..	119
6.4.5	Rural model: watershed discharge from dairy cattle farms watershed contribution to oocysts load in surface water .....	126
6.5	Conclusion.....	129
6.6	Acknowledgments .....	129
CHAPITRE 7.	SYNTHÈSE ET DISCUSSION .....	130
7.1	Quantification de la fraction infectieuse des oocystes: Développement, Optimisation et Validation de la 3D-CC-IFA .....	130
7.2	À la recherche du <i>Crypto</i> des villes et du <i>Crypto</i> des champs .....	134
7.3	Élaboration d’outil de prédiction simple et pratique pour les traiters d’eau .....	140
CHAPITRE 8.	CONCLUSION ET RECOMMANDATIONS .....	145
CHAPITRE 9.	BIBLIOGRAPHIE .....	148

## LISTE DES TABLEAUX

Tableau 2.1: Espèces reconnues de <i>Cryptosporidium</i> pouvant infecter l'humain et leurs différents hôtes (Xiao and Ryan, 2004).....	8
Tableau 2.2: Résumé des différentes méthodes de détection des oocystes de <i>Cryptosporidium</i> ssp et leurs applications. ....	24
Tableau 2.3: Revue d'études documentant la présence d'oocystes infectieux dans l'environnement telle que déterminée par des méthodes en culture cellulaire .....	29
Table 4.1: Stimulation conditions, infection media, and infection criteria of various <i>Cryptosporidium</i> viability and infectivity studies. ....	53
Table 4.2: Impact of reference total oocyst count on the calculated percentage of infectious oocysts in experiments performed at various steps of the 3D-CC-IFA with spikes of flow cytometry sorted oocysts. Direct = $((\text{foci} \times 100) / (\text{total oocyst post infection steps}))$ and Indirect = $((\text{foci} \times 100) / (\text{total oocyst initially inoculated}))$ .....	71
Table 5.1: Environmental performances of 3D-CC-IFA as infectivity rates (foci counts reported on total counts) and total ColorSeed™ recoveries for <i>Cryptosporidium</i> , and of USEPA Method 1623 as a total ColorSeed™ recoveries for <i>Giardia</i> .....	86
Table 6.1: Selected studies associating bacterial, viral and physical indicators to <i>Cryptosporidium</i> oocysts in various types of matrixes. ....	106
Table 6.2: Parasites, microbial and environmental parameters in raw sewage and WWTP effluents and rural discharge stream (GM: geometric mean, AR: arithmetic average, SD: standard deviation). ....	116
Table 6.3: Parasites, microbial and environmental ratio of indicators and parasites in urban (2 WWTP effluents) and rural stream discharge (GM: geometric mean, AR: arithmetic average, SD: standard deviation). ....	118
Table 6.4: Urban (a) and rural (b) models variable description, distributions and sources/references with (c) rural and urban model loading equations. ....	120

## LISTE DES FIGURES

Figure 2.1: Cycle de vie de <i>Cryptosporidium</i> ssp. dans le tube digestif de son hôte (tiré de Smith <i>et al.</i> (2005)).....	9
Figure 2.2: Observations microscopiques de <i>Cryptosporidium</i> de a) un foyer infectieux marqué au FITC, b) trois oocystes marqués au CY3, c) groupe d'oocystes marqués au DAPI et d) combinaison de foyer (CY3) et d'un oocyste (FITC). Les marqueurs blancs sont d'environ 10 $\mu$ m. ....	23
Figure 4.1: Summary of the sequence of steps of the final 3D-CC-IFA method.....	63
Figure 4.2: Impact of trypsin and pepsin addition in the stimulation pretreatment (AHBSS for 1 hr at 37°C) of <i>C. parvum</i> cell culture infection foci (combined data from 1-5 experiments; n=3-15). ....	64
Figure 4.3: Impact of bile addition in pretreatment stimulation (pH 7.4) and infection media (IM) on <i>C. parvum</i> cell culture infection foci and calculation of percentage of infectious oocysts in the inocula (n = 2; bars are minimum and maximum) .....	65
Figure 4.4: Effect of glucose concentration on the development of infection foci (combined data from 1-5 experiments; n = 3-11) .....	66
Figure 4.5: Recovery of oocysts during processing steps of the CC-IFA method (n = 15). For the stimulation and post-infection processing steps oocysts were recovered from spent sample washes by filtration. ....	67
Figure 4.6: Adherence of UV-inactivated oocysts (100mJ/cm <sup>2</sup> by collimated beam) to cell monolayers (n = 3, Errors bars are standard deviations).....	68
Figure 4.7: Comparison of reported by the USEPA and measured (this study) oocyst loss through steps of the US EPA 1622/3 method and of the 3D-CC-IFA in two different natural waters and MilliQ water using flow cytometry sorted <i>C. parvum</i> oocysts. IFA: Immunofluorescent assay microscopy. ICRSS: Information Collection Rule Supplemental Surveys, (Connell <i>et al.</i> , 2000). Errors bars are standard deviations.....	69
Figure 4.8: Superposed 3D-CC-IFA images (1000X magnification) of a <i>Cryptosporidium</i> cell culture infection focus stained with CY3-labeled Sporo-Glo antibody (red) and an oocyst stained with FITC-labeled GC Combo antibody (green). ....	71

- Figure 5.1: Concentrations and % positive samples of *Cryptosporidium* (3D-CC-IFA) and *Giardia* (USEPA Method 1623) in urban sewage sources (April to November, 2009) (data corrected for average recoveries performed for each matrix). Detection limits for both parasites varied from 1.5 to 4 (oo)cysts L<sup>-1</sup> for influents and from 0.33 to 2 (oo)cysts L<sup>-1</sup> for effluents. ....88
- Figure 5.2: Fractions (%) of infectious *Cryptosporidium* (3D-CC-IFA) and *Giardia* viability (DAPI +) with “n” = number of positive samples, and “% positive” is the ratio of infectious oocysts counts reported to total positive counts. ....89
- Figure 5.3: Concentrations and % positive samples of *Cryptosporidium* (3D-CC-IFA) and *Giardia* (USEPA 1623) in rural fecal sources (April to November, 2009) with data corrected for recovery (average recovery for each fecal matrix and daily recovery value for discharge samples). Calf, cow, and manure composite sample results expressed per g of feces and discharge results per 100 L. Detection limits were 2 (oo)cysts g<sup>-1</sup> for feces and manure, and ranged from 7 to 87 (oo)cysts 100 L<sup>-1</sup>. ....90
- Figure 5.4: Fractions (%) of infectious *Cryptosporidium* (3D-CC-IFA) and viable *Giardia* (DAPI +). Calf and cow fresh feces are composite samples. “n” = number of positive samples, and “% positive” is the ratio of infectious oocyst counts reported to total positive counts. ....92
- Figure 6.1: Log removal of physical parameters (TSS: total suspended solids and turbidity), microbiological indicators (*Enterococci*, *E. coli* and total coliforms) and pathogenic protozoan (*Cryptosporidium* and *Giardia*) by an aerated lagoons WWTP-S (n = 4-13), a sequential bioreactor WWTP-V (n = 2-8) and combined data from 6 secondary WWTP of Rose *et al.* (2004) study (n = 31-33). Data pairs including values BDL were removed. ....113
- Figure 6.2: Concentrations of *Cryptosporidium* oocysts, *Giardia* cysts and *Enterococci* with daily precipitation and the Castor discharge daily stream flow rate for year 2009. ((Oo)cysts data were corrected for recoveries measured on every sample). ....116
- Figure 6.3: Relationship between daily loads and concentrations of *Cryptosporidium* oocysts and load of *E. coli*, *Enterococci* ( $r^2 = 0.33$ ) and 5 days cumulative precipitations. Daily loads are the results of measured concentration multiplied by daily discharge stream flow. ....118
- Figure 6.4: Probability distributions of total and infectious *Cryptosporidium* using baseline (BL) and upper (UP) scenario loads from WWTP-S discharge. ....123

Figure 6.5: Probability distribution of total and infectious oocysts daily produced by animal equivalent using baseline and upper production scenarios in a) animals and b) stream discharge.....124



## LISTE DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS

(oo)cysts	‘oocysts and cyst’; oocystes et kystes
3D-CC-IFA	Méthode de détection double et directe sur culture cellulaire et analyse par immunofluorescence; ‘Dual direct detection on cell culture with an immunofluorescent assay’
ADN	Acide désoxyribonucléique
AL	‘Areated lagoons’
ARN	Acide ribonucléique
BDL	Sous la limite de détection; ‘Below detection limit’
BL	‘Baseline’
CC-FDM-MPN	‘Cell culture foci detection method most probable number’
CC-IFA	Méthode de détection sur culture cellulaire et analyse par immunofluorescence; ‘Detection on cell culture with an immunofluorescent assay’
CC-PCR	Méthode de détection sur culture cellulaire et analyse par PCR; ‘Detection on cell culture with a PCR assay’
CC-qPCR	Méthode de détection sur culture cellulaire et analyse par PCR en temps réel; ‘Detection on cell culture with a real time PCR assay’
CC-RT-PCR	Méthode de détection sur culture cellulaire et analyse par PCR en transcriptase inverse; ‘Detection on cell culture with a reverse transcriptase PCR assay’
CSO	Eaux usées combinées de surverse; ‘combined sewer overflow’
CY3	‘cyanine’
DAPI	4',6-diamidino-2-phenylindole
DIC	‘Differential interference contrast’
DNA	‘Deoxyribonucleic acid’
DWI	‘Drinking water inspectorate’
DWI	‘Drinking water intake’
EMEM	‘Eagle’s MEM’

FBS	Sérum de boeuf fetal; 'Fetal Beef Serum'
FISH	Hybridation <i>in situ</i> avec fluorescence; 'Fluorescent <i>in situ</i> hybridization'
FITC	'Fluorescein isothiocyanate'
HBSS	'Hank's Balanced Salts Solution'
HRT	'Hydraulic retention time,
ICR	'Information collection rule'
ICRSS	'Information collection rule supplemental survey'
IMS	Séparation immunomagnétique; 'Immunomagnetic separation'
IRDA	Institut de recherché et de développement en agroenvironnement
KS	Kolmogorov-Smirnov
LD	Limite de détection
LT2ESWTR	'Long term 2 enhanced surface water treatment rule'
MC	Monte-Carlo
MDDEP	Ministère du Développement Durable et des Parcs
MEM	'Minimal Essential Medium'
MES	Matière en suspension
MPN	Méthode du nombre le plus probable; 'Most Probable number'
PCR	Réaction de polymérisation en chaine; 'Polymerase chain reaction'
PDF	Distribution de fonction de probabilité; 'Probability distribution function'
QMRA	Analyse de risque microbiologique quantitative; 'Quantitative microbial risk assessment'
Ref Meth	Reference method
RNA	'Ribonucleic acid'
RQEP	Règlement sur la qualité de l'eau potable
RS	'Raw sewage'
SBR	'Sequential bioreactor'
STEP	Station d'épuration des eaux usées
TSS	'Total suspended solid'
UP	'Upper'
USEPA	'United States Environmental Protection Agency'
UV	Ultra violet

WHO	World health organisation
WWTP	‘Wastewater treatment plant’

## AVANT-PROPOS

En 2005, mon compagnon de vie et moi avons profité de points tournants dans nos vies afin de partir à la découverte de l'Asie. En personnes responsables, nous avons judicieusement planifié notre retour. Détenant un baccalauréat en biochimie, j'avais déjà accumulé quelques années d'expériences en recherche pharmaceutique, spécialisées en purification de protéine. Désireuse de faire une maîtrise afin de mener Mon Projet, la direction naturelle consistait à poursuivre ma formation en purification et caractérisation moléculaire de protéine. J'avais donc trouvé un bout de paille qui m'attendrait à notre retour, dans un laboratoire de McGill.

Nos péripéties asiatiques débutèrent et les aventures allaient de bon train. À quelque part dans cette histoire, nous nous sommes retrouvés en Chine rurale, à parcourir un sentier sur les bords de la rivière Jaune, près de sa source dans les montagnes himalayennes. Après quelques jours de marche à observer cette fameuse rivière coincée au fond d'un canyon imposant, j'ai été frappé à quel point j'aimerais faire quelque chose de plus appliquée comme carrière. Explorer les détails chimiques de la vie m'avait toujours fasciné mais... l'amélioration plus directe de la santé des gens ne serait-elle pas une plus grande source d'accomplissement? Comment transformer mon univers de pipettes inspectant les grosses molécules du petit monde en quelque chose de plus étendu? Comment arriver à améliorer la vie des gens plus directement?

En regardant les eaux opaques de la rivière Jaune, la nécessité universelle de l'eau de bonne qualité et en bonne quantité s'est imposée. Qu'y-a-t-il de plus important que l'eau pour la vie? Son omniprésence dans la qualité de la vie des gens est manifeste : hygiène, production alimentaire, écologie représentent des exemples directs mais elle influence aussi l'éducation des enfants en pays sous-développés qui doivent investir beaucoup de temps à sa quête, l'économie de région éloignée par le développement de central hydroélectrique pour la production d'aluminium... Mes pensées, sous le charme de cette rivière mythique, imaginaient son cours traversant la Chine surpeuplée et se transformant en lieu de pêche, en eau d'irrigation, en bain, en production d'électricité, en voie de transport et en eau qui abreuve certainement des millions de personnes sur son chemin.

De retour en milieu urbain, je me suis mise à la recherche d'eau et de santé publique dans un petit café internet enfumé en sirotant un thé vert brulant. Michèle Prévost – Polytechnique. En ingénierie? Je n'ai pas fait de math depuis... je ne sais plus. En ingénierie? En ingénierie...

J'ai donc envoyé mon CV à Dr. Prévost en lui posant les questions : est-ce qu'une biochimiste peut œuvrer dans le domaine de l'eau à Polytechnique? Qu'est-ce que je pourrais apprendre et apporter à ce domaine?

Le lendemain matin, une réponse à mon courriel m'attendait. Il y était question d'un certain *Cryptosporidium* et de ses oocystes infectieux.

## CHAPITRE 1. INTRODUCTION

### 1.1 Mise en contexte

Plus de cent ans se sont écoulés depuis la découverte par Ernest Edward Tyzzer (Tyzzer, 1907) d'un sporozoaire pathogène pour la souris commune nommé *Cryptosporidium*. Ses impacts sanitaires n'ont néanmoins été notés que dans les années '70, où des cas de diarrhée chez le bétail et chez les humains lui ont été associés. Au cours des années 80, plusieurs cas de cryptosporidiose ont été rapportés, notamment chez des hommes adultes atteints du nouveau et tragique syndrome d'immunodéficience acquise (Fayer and Xiao, 2007). Les premières éclosions d'importance (> 500 cas) reliées à l'eau potable ont alors ensuite été recensées soit au États-Unis (1984, Texas; 1989, Georgia) et au Royaume Uni (1986, Sheffield; 1988-9 Swindon et Oxfordshire) (Karanis *et al.*, 2007). Durant les années 90, une éclosion massive d'origine hydrique dans la ville de Milwaukee (WI, USA) a fait sa marque avec le quart de la population atteint de diarrhée aqueuse (Mac Kenzie *et al.*, 1994). Ce qui lui vaut d'ailleurs d'être le responsable de 94% des cas de gastro-entériques parasitaires aux États-Unis de 1971 à 2006 et de 9% des éclosions (Craun *et al.*, 2010). Durant les dix dernières années, *Cryptosporidium* a été le sujet de près de 4 500 publications scientifiques (Isi Web of Knowledge™, décembre 2010) et son suivi est rigoureusement réglementé dans plusieurs pays développés (Drinking Water Inspectorate (DWI), 2000; USEPA, 2006b).

En traitement de l'eau potable, il constitue avec *Giardia* et les virus entériques une des principales cibles de désinfection à atteindre. Ce rôle lui fût attribué en raison de plusieurs caractéristiques qui facilitent sa transmission via l'eau potable (WHO, 2006, 2009). En effet, le genre *Cryptosporidium* détient plusieurs espèces, dont certaines anthropogéniques (*C. parvum*) et d'autres zoonotiques (*C. parvum*). Ainsi, les espèces pathogènes pour l'humain peuvent être présentes dans des environnements variés tels que forestiers, ruraux et urbains (Heitman *et al.*, 2002; Olson *et al.*, 2004; Payment, 2003; Robertson *et al.*, 2006). Aussi, ses hôtes excrètent un grand nombre d'oocystes, jusqu'à  $10^7$  par gramme de fèces chez l'humain et les veaux (Chappell *et al.*, 1999; Xiao and Herd, 1993). Ainsi relâchés dans l'environnement, les oocystes peuvent

survivre dans les fèces, les sols, les eaux de surface et les sédiments pendant des mois (Ferguson *et al.*, 2003; Ives *et al.*, 2007; King *et al.*, 2005; King and Monis, 2007; Li *et al.*, 2005; Robertson *et al.*, 1992). Lorsqu'ils atteignent les stations de traitements d'eau potable, les oocystes sont considérés comme le protozoaire le plus difficile à enlever par voie physique en raison de sa petite taille. Aussi, sa grande résistance à la désinfection, particulièrement à la chloration, rend plusieurs filières de traitement vulnérables (Korich *et al.*, 1990). Le passage d'oocystes dans l'eau traitée est documenté (Smeets *et al.*, 2007) et une faible dose infectieuse d'une centaine d'oocystes peut engendrer la maladie (Chappell *et al.*, 2006; DuPont *et al.*, 1995). Des éclosions ont d'ailleurs été causées par de très faibles concentrations d'oocystes à l'eau traitée (Neira-Munoz *et al.*, 2007).

Aux États-Unis, les éclosions de maladie reliées à l'eau de surface potabilisée ont diminué depuis 1989, soit après l'entrée en vigueur de règlement initial du Surface Water Treatment Rule (SWTR). En effet, sauf de rares exceptions strictement justifiées, la filtration et la désinfection des eaux de surface sont devenues obligatoires (Craun *et al.*, 2010). Ce règlement demandait aux traitants d'eau d'enlever ou d'inactiver 3 log de kystes de *Giardia* (USEPA, 1989), ce qui diminua du même coup la présence des oocystes. Suite aux événements tragiques de Milwaukee en 1993, une refonte du règlement a eu lieu et les systèmes de traitement d'eau potable utilisant des eaux de surface ou des eaux souterraines sous influences devaient rencontrer des indices de performances reliés à la turbidité (USEPA, 1998a). La mouture la plus récente de leur réglementation, le Long Term 2 Enhanced Surface Water Treatment Rule (LT2ESWTR), exige un échantillonnage mensuel à l'eau brute pendant deux ans pour toutes les stations traitants des eaux de surface. La moyenne dégagée de cette campagne sert à classer la qualité de l'eau alimentant les stations selon un système de "Bin". Par exemple, le niveau de meilleure qualité (Bin 1) correspond aux eaux brutes ayant une moyenne de moins de 0.075 oocystes L<sup>-1</sup> et aux exigences de traitement minimales. Des niveaux maximaux de traitement sont exigés pour des eaux brutes ayant une moyenne de plus de 3 oocystes L<sup>-1</sup> (Bin 4). On exige alors 2.5 logs d'inactivation additionnels avec au moins 1 log par désinfection (USEPA, 2006a).

La sévère réglementation anglaise du Drinking Water Inspectorate (DWI) stipule que l'eau traitée doit être sous surveillance continue (DWI, 2000) à moins qu'une analyse de risque révèle un

niveau de risque négligeable. Dans le cadre de cette législation, la présence de plus d'un oocyste par 10 litres d'eau filtrée est sujette à une poursuite criminelle (Fayer and Xiao, 2007). Aussi, le protocole de laboratoire standardisé ne compte que les oocystes totaux (DWI, 2000), les filières offrant un abattement physique des oocystes sont ainsi avantagées.

Plus près de nous, le Guide de conception du Ministère du Développement Durable, de l'Environnement et des Parcs du Québec (MDDEP) précise que l'un des critères minimaux de conception de station de production d'eau potable repose sur l'enlèvement de 99% des oocystes de *Cryptosporidium* pour une eau brute de surface (MDDEP, 2002). Ce niveau d'enlèvement est dicté par le principe de précaution, car il ne tient pas compte des quantités réelles d'oocystes. Leur présence est effectivement peu connue au Québec, la complexité des méthodes et les coûts qu'elles engendrent étant prohibitifs.

Quoique la promulgation d'exigences d'enlèvement de *Cryptosporidium* soit tout à fait justifiable, de nombreux doutes subsistent quand au calcul des risques associés à la consommation d'eau potable contenant des oocystes. Une meilleure estimation du risque réel d'infection que représente la présence d'oocystes dans une source donnée s'impose afin d'optimiser, tant du côté de la santé humaine que des coûts engendrés, les filières de traitement.

L'évaluation de ce risque repose d'abord sur l'estimation de l'occurrence générale des oocystes infectieux pour l'humain détectés dans les eaux brutes et traitées de station de production d'eau potable. Les oocystes dits infectieux pour l'humain doivent d'abord être d'une espèce compatible (*C. parvum* et *C. hominis*) mais aussi, avoir conservé leur infectivité lors de leur passage dans l'environnement. Dans ce contexte, les méthodes de traditionnelles de comptes totaux ne permettent pas de discerner ni l'espèce ni l'infectivité, alors que certaines méthodes avancées en biologie cellulaire le pourraient.

Les premiers travaux de recherche présentés dans cette thèse ont ciblé le développement d'une méthode capable de quantifier la fraction infectieuse des oocystes récoltés dans divers environnements (Chapitre 3). L'étape suivante des travaux de recherche a visé la quantification de cette fraction infectieuse par une campagne d'échantillonnage. La cueillette d'échantillon



devait initialement être effectuée dans les eaux brutes de stations de production d'eau potable. Cependant, l'estimation du sous-ensemble d'oocystes infectieux n'était pas possible en raison de la rareté des oocystes totaux. C'est pourquoi l'échantillonnage a ciblé des sources plus concentrées d'oocystes infectieux pour l'homme: les eaux usées et le milieu agricole (Chapitre 4). Suite aux résultats de cette campagne et à ceux obtenus par d'autres auteurs, les flux massiques d'oocystes et les concentrations résultantes dans l'environnement ont été estimés, modélisés et corrélés aux précipitations (Chapitre 5). Les concentrations d'oocystes et de kystes ont ensuite été corrélées à celles d'indicateurs microbiologiques et physicochimiques. Des modèles décrivant leur charge par personne ou par animal par jour ont aussi été développés dans l'optique d'une conception globale du risque que les oocystes posent dans un plan d'eau influencé par des sources de pollution fécales urbaines et rurales.

## 1.2 Structure de la thèse

Cette thèse propose premièrement une revue de littérature présentant un survol de la biologie, de l'épidémiologie et des barrières limitant l'exposition à l'humain de *Cryptosporidium*. Par la suite, on y expose les méthodes de concentration, d'isolation et de dénombrements totaux, viables et infectieux de ses oocystes dans différentes matrices environnementales ainsi que leur occurrence dans des environnements variés. Les relations connues entre les indicateurs et *Cryptosporidium* complètent finalement cette revue (Chapitre 1). Le second chapitre présente les objectifs de recherche ainsi que la démarche expérimentale. Les chapitres 3, 4, 5 présentent l'essentiel des résultats de la recherche sous forme de trois publications scientifiques couvrant le développement et l'optimisation d'une méthode mesurant la fraction infectieuse des oocystes, une campagne d'échantillonnage de ces fractions infectieuses dans les sources de pollution fécale où les oocystes pathogènes pour l'humain sont présents et finalement, une démonstration des liens qui unissent la présence d'oocystes aux indicateurs et la présentation d'un outil de prédiction estimant la charge d'oocyste dans les eaux de surface. Enfin, le chapitre 6 offre une synthèse des travaux ainsi qu'une discussion générale pour finalement, mener à la conclusion et aux recommandations au chapitre 7.

## CHAPITRE 2. REVUE DE LA LITTÉRATURE

### 2.1 *Cryptosporidium* : une célébrité en potabilisation des eaux

#### 2.1.1 Biologie générale

*Cryptosporidium* est un eucaryote unicellulaire (protozoaire) se classe parmi l'embranchement des *Apicomplexa*, la classe des *Coccidia* et l'ordre des *Eucoccidiorida*, selon la taxonomie officielle du « National Center for Biotechnology Information » (NCBI).

Plusieurs espèces du genre *Cryptosporidium* ont été à ce jour identifiées. L'infectivité dirigée spécifiquement contre un ou des hôtes a classiquement été la première caractéristique à appuyer la classification des différents isolats. Comme cette caractéristique peut varier selon la dose, l'âge, les conditions de stockage, les méthodes d'isolation, les traitements chimiques que l'oocyste a subi ainsi que les expositions précédentes à différents hôtes (Xiao *et al.*, 2004), les méthodes moléculaires viennent aujourd'hui préciser ces classifications via les analyses de la variation des séquences des locus 18S rRNA et HSP70 (Carey *et al.*, 2004). Il est intéressant de noter que, depuis 2002, *C. parvum* a été officiellement divisé en deux espèces : *C. parvum* (le génotype "bovin" infectant plus de 150 espèces de mammifère dont l'humain) et *C. hominis* (le génotype "humain" restreint, sauf pour quelques rares exceptions, à l'humain) (Morgan-Ryan *et al.*, 2002). Lorsque l'intérêt d'étudier les oocystes de *Cryptosporidium* se situe au niveau de la santé publique humaine, l'importance de bien discerner l'espèce présente se manifeste. Tel que résumé par le Tableau 2.1, les espèces reliées de près à l'humain se limitent à *C. parvum* et *C. hominis*. Dans de quelques rares cas, spécialement chez des populations immunodéprimées, *C. muris*, *C. felis*, *C. canis* et *C. meleagridis* ont contaminé des humains (Xiao and Ryan, 2004).

Ce parasite obligatoire voyage d'un hôte à l'autre sous la forme d'oocyste d'environ 5 µm de diamètre. Lorsqu'ingérée, cette capsule à parois très résistante colonise les parois du petit intestin ou de l'estomac selon l'espèce (Smith *et al.*, 2005). Son cycle de vie complet est illustré par la Figure 2.1. Suite à l'ingestion d'oocystes via, par exemple, de l'eau ou de la nourriture contaminées, la température corporelle et l'acidité de l'estomac (pH 1.5 - 3.5) active l'excystation

Tableau 2.1: Espèces reconnues de *Cryptosporidium* pouvant infecter l'humain et leurs différents hôtes (Xiao and Ryan, 2004)

Espèce	Hôte principal	Hôte secondaire
<i>C. hominis</i>	Humains, singes	Dugongs, moutons
<i>C. parvum</i>	Bovins, chèvres, humains, moutons	Chevreuril, porcs, souris
<i>C. meleagridis</i>	Dindes, humains	Perroquets
<i>C. canis</i>	Chiens	Humains
<i>C. felis</i>	Chats	Bovins, humains
<i>C. muris</i>	Chameaux, rongeurs	Chèvres de montagne, humains

(Kato *et al.*, 2001; Smith *et al.*, 2005). L'oocyste voyage ensuite jusqu'au petit intestin où le chyme est neutralisé à pH 8. Les sels biliaires sécrétés semblent aussi avoir un effet pro-excystation (Kato *et al.*, 2001). La trypsine, dont son précurseur est libéré par le pancréas, entre ensuite en jeu dans la digestion. La plupart des auteurs utilisent la trypsine à pH acide et la définissent comme une activatrice d'excystation (Hijjawi *et al.*, 2004; Johnson *et al.*, 2007; Di Giovanni et LeChevallier, 2005; Aboytes *et al.*, 2004; LeChevallier *et al.*, 2003). Certains lui démontrent même un effet dans la motilité des sporozoïdes (Smith *et al.*, 2005). Ces derniers, au compte de quatre par oocyste, émergent de l'oocyste au travers de sa suture. Ils colonisent ainsi les entérocytes en formant une vacuole intracellulaire mais extra-cytoplasmique nommée vacuole

parasitaire<sup>1</sup>. Les sels biliaires, spécialement le sodium taurocholate, semblent accroître le pouvoir envahissant des sporozoïdes en augmentant leurs sécrétions protéiques et leur glissement. (Feng *et al.*, 2006; Kato *et al.*, 2001). Ainsi logé, les sporozoïdes entament la suite invasive de leur cycle cellulaire. Le premier stade d'amplification, la mérogonie, est asexué et vise la colonisation des cellules avoisinantes. Les mérozoïdes vont ensuite devenir soit microgamonts ou macrogamonts. Ces gamètes marquent le début de la phase sexuée de leur reproduction, la gamétogonie, où les microgamonts fertilisent les macrogamonts (Barta et Thompson, 2006). Le zygote formé va évoluer jusqu'à devenir oocyste. De là, l'excrétion ou l'auto-infection marquera le début d'un autre cycle et créera de nouveaux foyers infectieux.

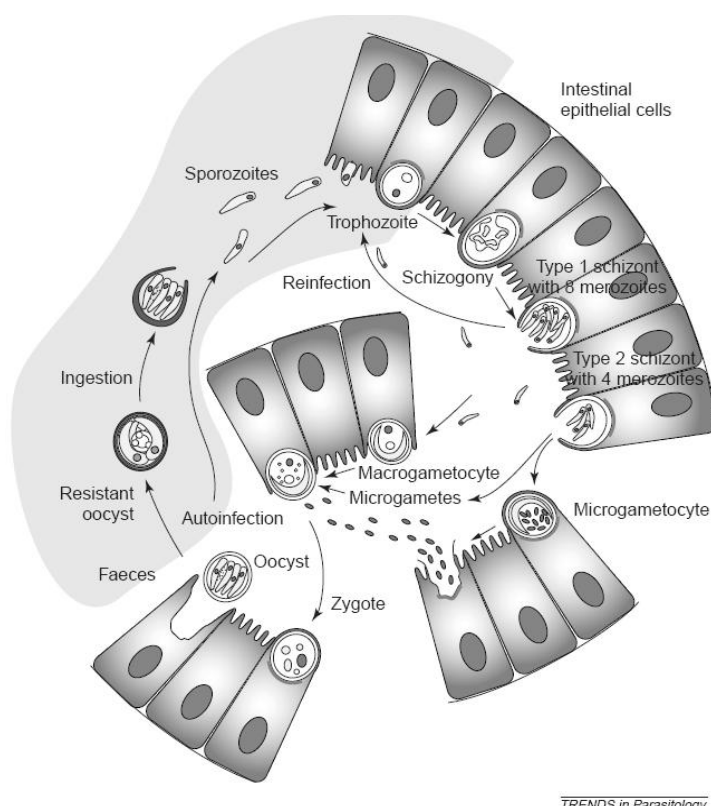


Figure 2.1: Cycle de vie de *Cryptosporidium* ssp. dans le tube digestif de son hôte (tiré de Smith *et al.*(2005)).

<sup>1</sup> Vacuole parasitaire est une traduction personnelle de « *parasitophorous vacuole* ».

### 2.1.2 Épidémiologie

Les cryptosporidioses sont des entérites plus ou moins sévères, allant d'asymptomatiques jusqu'à chroniques, voir même mortelles, selon l'état immunologique de l'hôte (compétent, compromis ou déprimé) et leur groupe d'âge. Les symptômes les plus communs comprennent la diarrhée plus ou moins liquide, les crampes abdominales, la fatigue, la perte d'appétit et la nausée et persistent d'une à trois semaines (Chappell *et al.*, 2006; DuPont *et al.*, 1995; Mac Kenzie *et al.*, 1994). Lorsqu'infecté, le traitement des symptômes suffit généralement à la guérison. Cependant, dans les cas plus complexes, certains traitements sont recommandés, le plus étudié étant le traitement avec le Nitazoxanide. Ce médicament à large spectre s'est montré efficace dans la lutte contre plusieurs types d'infections gastro-intestinales (Hemphill *et al.*, 2006). Dans le cas de *Cryptosporidium*, une étude montre qu'une dose de 500 mg, deux fois par jour pendant trois jours offre un taux de guérison de 93% chez des personnes non-immunodéficientes de plus de 12 ans (Rossignol *et al.*, 2006).

Les cas de cryptosporidiose sont présents partout dans le monde. Plus d'un million de cas en Europe et en Amérique du Nord ont été rapportés et il est estimé que 60% des eaux de surface nord américaines contiennent des oocystes de *Cryptosporidium* (Cacciò *et al.*, 2005). L'eau potable contaminée par *Cryptosporidium* peut-être blâmée dans 23.7% des épidémies hydriques causées par des protozoaires recensées dans le monde entre 1954 et 2002 (Karanis *et al.*, 2007). Aux États-Unis, de 1991-2002, il fût l'agent étiologique le plus identifié (7%) lors de maladie d'origine hydrique relié à l'eau potable (Craun *et al.*, 2006).

Ces éclosions surviennent en régions agricoles et urbaines. Comme les caractéristiques épidémiologiques varient entre ces environnements, il devient intéressant de les distinguer pour bien comprendre les risques d'infection de ces populations. D'abord, les espèces en cause peuvent être différentes. *C. hominis* suggère une source humaine, plutôt urbaine, tandis que l'identification de *C. parvum* suggère plusieurs sources de contamination telles que la faune, les déchets agricoles et/ou humains. Ensuite, les mécanismes de contrôles et de transports influencent la prévalence des oocystes (p.ex. : rejets d'eaux usées et lessivage pluvial des sols avec épandage de fumier) qui diffèrent considérablement en milieux urbains et agricoles (voir

section 2.1.3.1.). Dans l'ouest canadien, un suivi des oocystes a montré qu'une source d'eau en milieu forestier cumule une moyenne annuelle trois fois inférieure à celle d'une source en milieu agricole (Isaac-Renton *et al.*, 2005). Une étude ontarienne a démontré que les infections à *Giardia*, proche parent de *Cryptosporidium*, ont un plus haut taux d'incidence en milieu rural (Odoi *et al.*, 2004). Sous un autre angle, des tests sérologiques ont trouvé plus de positifs chez les fermiers que chez la population non exposée aux animaux de ferme (Ramirez *et al.*, 2004). La mesure des infections d'étudiants participant à un programme en science animale au Wisconsin, suggère que le contact avec des animaux de ferme augmente significativement le risque (ratio 8 :1) de contracter une cryptosporidiose (Kiang *et al.*, 2006). D'un aspect démographique, une étude Albertaine a déterminé près de 80% des cas de cryptosporidiose surviennent chez les moins de 20 ans (Laupland and Church, 2005). Les données ont aussi mis une évidence une plus grande sensibilité des enfants de moins de 5 ans (Mosier et Oberst, 2000). Aussi, l'état d'immunité des habitants joue sur leur sensibilité à l'espèce à laquelle ils sont exposés. Chez les individus immuno-compétants, *C. parvum* et *C. hominis* sont responsables d'environ respectivement 51% et de 46% des cas tandis que chez les individus immuno-compromis, ces proportions sont de respectivement 23% et 57% (Cacciò *et al.*, 2005). Somme toute, les cycles de la maladie et les éclosions répondent à différents facteurs qui sont eux-mêmes influencés par les activités générant les oocystes et leurs conditions environnementales de transport.

Au Canada, la première éclosion reliée à l'eau potable remonte en 1993 à Kitchener-Waterloo (Ontario). Une combinaison de traitement déficient de l'eau et une source d'eau contaminée a causé près de 24 000 cas (Craun *et al.*, 1998). Trois ans plus tard, toujours en Ontario, une éclosion de 189 cas est observée à Collingwood suite à des conditions de pluviométrie extrêmes (récurrence 1 dans de 100 ans) (Craun *et al.*, 1998). On dénombre en 1997 plus de 100 personnes atteintes dans une la ville ontarienne de Shoal Lake (Karanis *et al.*, 2007). Finalement, le cas canadien le plus récent, soit en 2001, s'est produit à North Battleford (Sask.). Une combinaison de filtration déficiente et de détérioration de la qualité de l'eau brute a causé une éclosion avec de 5 800 à 7 100 personnes (Jameson *et al.*, 2008).

### **2.1.2.1 Transmission via l'eau récréative**

Les accidents des baigneurs ou les enfants en couche dans les eaux récréatives sont des risques de contamination non négligeables. En effet, Sunderland *et al* (2007) a démontré qu'il y a une différence significative entre la quantité d'oocyste viable de *C. parvum* (méthode FISH) trouvée aux plages au cours des journées de forte et de faible achalandage (moyennes de fin de semaine : 14 oocystes L<sup>-1</sup> et de semaine : 2 oocystes L<sup>-1</sup>). Depuis 1988, aux États-Unis, *Cryptosporidium* est l'agent infectieux de 71% des cas de gastro-entérite aigue associés aux eaux récréatives (n=20 441). Il est cependant le fautif que dans 12% des cas associés à des environnements naturels et non traités (p.ex. rivière et lac) (n=5 386) mais dans 91.6% des cas associés aux eaux artificielles et traitées (p.ex. piscine, parc aquatique) (n=15 055) (Fayer and Xiao, 2007).

### **2.1.3 Barrières et contrôles limitant l'exposition à l'humain**

L'évaluation de l'atténuation et/ou de l'enlèvement des oocystes reflète directement les limitations et les forces des méthodes de mesure utilisées pour les estimer. Pour l'atténuation, certains auteurs utilisent des techniques de viabilité, d'autres d'infectivité ayant souvent un protocole local et unique. Concernant l'enlèvement, les méthodes peuvent être décrites comme un peu plus homogènes (p. ex. : US EPA 1623, US EPA ICR) mais les effets non négligeable de matrices variables et hétérogènes, des comptes souvent près des limites de détection ainsi que la présence/absence de correction pour les taux de récupération viennent affecter la comparaison entre les résultats. Prière de consulter la section 2.2 pour plus de détails sur les méthodes.

#### **2.1.3.1 Traitement des sources de pollution fécales urbaines et agricoles**

##### **2.1.3.1.1 Traitement des eaux usées municipales**

Des oocystes d'origine principalement humaine (Cheng *et al.*, 2009; Quintero-Betancourt *et al.*, 2003; Ward *et al.*, 2002) se retrouvent inévitablement dans les affluents des STEP municipales. Selon les études, la prévalence aux affluents de ces stations de *Cryptosporidium ssp.* varie de 30 à 100% (Fu *et al.*, 2010; McCuin and Clancy, 2006; Montemayor *et al.*, 2005; Robertson *et al.*, 2006) avec des concentrations allant jusqu'à 24 000 oocystes L<sup>-1</sup> (Robertson *et al.*, 2006) et ce, en

pays développés. Bien que l'enlèvement ou l'atténuation des oocystes ne compte pas parmi leurs principaux objectifs de traitement, les STEP parviennent néanmoins à retirer une partie de la charge d'oocyste relarguée dans l'environnement par les eaux usées. Les différents traitements des eaux usées peuvent être grossièrement fragmentés en trois grandes étapes soient les traitements primaires, secondaires et tertiaires.

Les traitements primaires ont comme principal objectif la décantation des solides. Les oocystes de *Cryptosporidium* ayant une densité très proche de celle de l'eau n'auront pas l'opportunité d'y sédimenter à moins d'être associés à des particules plus denses (Medema *et al.*, 1998). Les traitements primaires incluent parfois un traitement physico-chimique de coagulation-sédimentation, ce qui contribue à trapper et décanter les oocystes. De faibles abattements ont été rapportés pour cette première étape, de l'ordre de 0 à 0.2 log (Payment *et al.*, 2001; Robertson *et al.*, 2006; Robertson *et al.*, 2000).

Concernant les traitements secondaires ou biologiques, ils consistent principalement à réduire la matière organique soluble (DBO<sub>5</sub>) en comblant les besoins nutritionnels de microorganismes. L'eau sortant du décanteur primaire passe dans un réacteur biologique à faible teneur en solide (2 000 mg/L), y est fortement aérée afin de stimuler la digestion microbienne et pour ensuite subir une étape de décantation. Dans le cas des oocystes, les principaux mécanismes d'enlèvement qui leur sont associés sont l'adsorption-sédimentation et les radiations solaires (Reinoso *et al.*, 2008; Wen *et al.*, 2009). Les possibles contributions de la prédation par des organismes supérieurs, des conditions physico-chimiques hostiles et de toxines algales ont aussi été soulignées (Reinoso *et al.*, 2008). Pour différents types de traitements biologiques, des moyennes d'enlèvements de 1.4 à 2.2 log ont été notés (Crockett, 2007; Fu *et al.*, 2010; Robertson *et al.*, 2000; Rose *et al.*, 2004). Lors d'une étude comparant plusieurs types de traitements biologiques naturels, le procédé ayant le temps de rétention le plus long se veut être le plus performant (Reinoso *et al.*, 2008). Par ailleurs, Cheng *et al.* (2009) relate que la viabilité (test FISH) des oocystes de *C. parvum* et *C. hominis* varie de 78.4-100%.

Les traitements tertiaires regroupent une vaste gamme de procédés ayant différents objectifs tels que l'enlèvement du phosphore, des nitrites et nitrates, des composés pharmaceutiques et de soins



personnels et la désinfection. Au sujet de *Cryptosporidium*, certains procédés contribueraient à leur enlèvement physique telle que la déphosphatation impliquant une coagulation/sédimentation (Fayer and Xiao, 2007) ainsi que la filtration (Paranychianakis *et al.*, 2006) tandis que d'autres auraient un potentiel de désinfection comme l'ozonation et la radiation UV. L'efficacité de ces derniers reste tout de même limitée par les interférences causées par l'importante présence de matière organique et de turbidité (Betancourt and Rose, 2004; Gehr *et al.*, 2003). Robertson *et al.* (2006) ont observé des enlèvements globaux de 0.3 log pour deux STEP ayant comme traitement tertiaire une filtration tandis que Crockett *et al.* (2007) soulignent 4.6 log au final. Rose *et al.* (2004) ont obtenu environ 2.2 log pour un groupe de six usines ayant en plus de la filtration, une étape de désinfection.

#### **2.1.3.1.2** *Gestion des fumiers agricoles en production laitière*

La gestion des déjections de vaches laitières diffère de celle des déjections humaines de part le contenu en eau plus important dans les eaux usées municipales. Deux principaux types de gestion des fumiers prévalent dans les installations de production laitière. La première, est celle de la gestion solide des fumiers et la seconde, la gestion liquide. Dans le premier cas, les fumiers relativement secs sont accumulés en pile (e.g. compostage) et dans le second, l'eau est utilisée pour le nettoyage des fumiers et le mélange s'accumule dans des réservoirs. Ce dernier mélange subit par la suite des traitements tels que des étangs aérobiques ou anaérobiques (Fayer and Xiao, 2007).

Dans les deux types de gestion, le taux de survie des oocystes dépend principalement de la température à laquelle ils sont exposés. Il est suggéré que les oocystes survivent mieux dans les sols que dans les fèces (Olson *et al.*, 2004). Il a été noté que le tiers des oocystes peuvent demeurer viable (méthode DAPI-PI) dans les fèces semi-solides de vache à température ambiante (Robertson *et al.*, 1992) mais qu'à partir de 25°C, la viabilité décroît (Ferguson *et al.*, 2003) et que au-delà de 40°C, 3 log d'inactivation par jour peuvent être atteint dans des fèces de vache (Li *et al.*, 2005). Pour les pays nordiques, soulignons que même en hiver, la chaleur interne des piles peut atteindre des températures suffisantes pour affecter la survie des oocystes (Jenkins *et al.*, 1999). La température est aussi bien présente dans les traitements en gestion liquide. Les

digesteurs anaérobies peuvent offrir jusqu'à 7 log d'inactivation en quelques heures (Garcés *et al.*, 2006). Un second joueur dans l'inactivation des oocystes est l'ammoniac ( $\text{NH}_3$ ). Il atteint de manière importante la survie des oocystes, spécialement à pH et à température élevés (Ferguson *et al.*, 2003; King and Monis, 2007). Les expériences de Jenkins (1999) ont démontré qu'une concentration de 13 mg de  $\text{NH}_3$  par litre réduit de 5 log en 120 jours la survie des oocystes. D'autre part, une étude sur le purin de porc traité par boues activées a démontré des enlèvements de 0.7 log d'oocystes et le séchage par la chaleur des boues associées a poussé cet enlèvement jusqu'à 4.3 log (Reinoso and Becares, 2008).

Les fumiers sont communément valorisés comme engrais dans les champs agricoles. Leur épandage contribue à l'entrée d'oocystes dans l'environnement et les soumet aux conditions environnementales présentes au champ. Ici encore, la température contribue à la décroissance de leur viabilité et ce, au-delà de 25°C (Ferguson *et al.*, 2003). Bien qu'il n'y est pas dépendage en hiver, le possible résiduel d'oocystes dans les sols est tué en 24h en-dessous de -20°C par les forces de cisaillement engendrés par les cristaux de glace (King and Monis, 2007). Il est aussi reconnu que les oocystes de *Cryptosporidium* survivent mal lors de conditions de dessiccation. Des expériences en laboratoire ont démontré qu'il est possible d'atteindre 100% d'inactivation lors de séchage à l'air après seulement 4h (Robertson *et al.*, 1992). Cependant, ces conditions extrêmes sont rarement présentes dans les sols et les fèces, ces derniers protégeant les oocystes (Ferguson *et al.*, 2003; King and Monis, 2007). Un autre joueur affectant la survie des oocystes est le rayonnement solaire (UV) mais, ici encore, l'effet protecteur du sol et des fèces les rendent peu efficace (King and Monis, 2007).

L'importance d'une période d'entreposage adéquate ainsi que l'épandage en dehors des journées de pluie se manifeste sachant que les oocystes frais se transportent mieux que les oocystes plus âgés (2-7 jours) (Atwill *et al.*, 2002). De plus, les oocystes provenant de fèces ont une plus grande tendance à se fixer aux particules du sol que les oocystes lessivés (Kuczyńska *et al.*, 2005). Le type de sol, les précipitations ainsi que la pente de la bande riveraine influencent la dispersion, la dilution et le transport des oocystes. La sédimentation de ces derniers est gouvernée par les conditions du sol (p. ex. : présence d'ions calciques et de manganèse, pH) qui les inciteront à se fixer à des particules plus denses (Ferguson *et al.*, 2003; King and Monis, 2007).

L'ajout de bandes riveraines est une pratique reconnue qui permet la filtration, l'adsorption et la sédimentation des oocystes de *Cryptosporidium*, réduisant ainsi leur concentration (Tate *et al.*, 2004). Peu d'oocystes se rendent plus profondément que 20 cm de la surface du sol (Atwill *et al.*, 2002; Mawdsley *et al.*, 1996), à moins qu'il y ait présence de chemin préférentiel créé, par exemple, par les racines (Pyke *et al.*, 2003). Ainsi, la contamination des eaux de surface est principalement attribuable aux ruissellements. Kistemann *et al.* (2002) ont évalué que, selon les sites, une augmentation de 15 à 38 fois le nombre d'oocystes en événements de pointe (fonte des neiges ou forte pluie) par rapport à la moyenne annuelle des échantillons pris hors pointe. Leurs résultats suggèrent aussi qu'un seul événement de 12h pourrait contribuer à 3 à 4% de la charge total d'oocystes annuelle. Pour une pente plus faible que 20% et au-delà d'une distance de 3 m, un enlèvement de 3 log a été estimé (Atwill *et al.*, 2002). En combinant les oocystes issues du lessivage du sol et ceux provenant du ruissellement souterrain, Tate *et al.* (2004) ont noté des enlèvements de 1.18-1.44 log m<sup>-1</sup> au cours des études menées en laboratoire. Lorsque l'inclinaison de la pente était inférieure à 5%, environ la moitié des oocystes provenaient du ruissellement et l'autre moitié du ruissellement souterrain. Par contre, pour des pentes de 12 et 20%, 98% les oocystes découlaient principalement du ruissellement. Peu d'information est cependant disponible sur la présence, le devenir et le transport des oocystes vers les eaux de surfaces parce que la grande majorité des études portent sur l'occurrence des oocystes dans les eaux brutes des stations de production d'eau potable (USEPA, 2010).

### **2.1.3.2 Survie dans les eaux de surfaces**

En provenance de rejets d'eaux usées traitées et non traitées (déviation de l'affluent de STEP, surverse de réseaux combinés), du lessivage des sols agricoles et de la faune, les oocystes atteignent les eaux de surfaces. Leur incapacité à se reproduire à l'extérieur de leur hôte est en soit une bonne nouvelle mais leur grande résistance aux conditions environnementales leur procure un redoutable outil leur permettant de retrouver un hôte potentiel où proliférer.

Le déclin de *C. parvum* a été estimé, pour des eaux de surface et des eaux souterraines, à 2 log pour une période de 10 à 18 jours à 30°C mais à plus de 200 jours à 5°C (Ives *et al.*, 2007), ce qui souligne leur sensibilité à des températures plus élevées. De manière plus détaillée, l'atténuation

de leur infectivité (méthode CC-qPCR) à 4, 15, 20 et 25°C a été évaluée respectivement à 0.01, 0.011, 0.048, 0.095 log jour<sup>-1</sup> (King *et al.*, 2005). D'autres recherches soutiennent qu'ils maintiennent leur infectivité (méthode CC-IFA) pendant plus de 14 semaines à 4°C et 10°C, mais, à 21-23°C, ils perdent leur infectivité (4 log) en 14 semaines (Pokorny *et al.*, 2002).

Un mécanisme d'enlèvement important dans l'eau de surface se veut être la sédimentation (Searcy *et al.*, 2006). Les oocystes peuvent voyager de longues distances si libres dans les cours d'eau, car leur densité se situe très proche de celle-ci. Crockett *et al.* (2007) ont estimé que des oocystes non attachés peuvent voyager dans un cours d'eau jusqu'à 160 km en 7 jours tout en gardant leur infectivité. Ils peuvent néanmoins sédimenter lorsqu'attachés à des particules plus denses (Medema *et al.*, 1998) et ainsi s'accumuler dans les sédiments. Ce phénomène est cependant transitoire, les oocystes pouvant passer d'attachés à libre (King and Monis, 2007) et se retrouver de nouveau en suspension dans la colonne d'eau.

Concernant leur survie en eau salée, elle semble légèrement compromise. Ceci ne les empêche pas de parasiter des organismes marins (Morgan *et al.*, 2000; Ryan *et al.*, 2004) ainsi que de s'accumuler dans les mollusques (Graczyk *et al.*, 2001) et y maintenir leur état infectieux pour l'humain (Graczyk *et al.*, 2006).

### **2.1.3.3 Production d'eau potable**

Lors du traitement des eaux de surfaces, deux grandes étapes de procédés peuvent être soulignées. D'abord, il y a l'enlèvement physico-chimique des contaminants qui comprend classiquement des filières de coagulation, floculation, décantation et filtration. S'en suit une ou des étapes de désinfection en station et en réseau ayant comme outils principaux le chlore et ses dérivés, l'ozone et la désinfection UV.

L'abattement des oocystes de *Cryptosporidium* fait partie de la réglementation de la production de l'eau potable en Amérique du Nord et en Angleterre. Afin de rencontrer les normes en vigueur, la majorité des stations utilise l'enlèvement physique des oocystes (Betancourt et Rose, 2004). Tel que mentionné précédemment, les oocystes décantent peu si non attachés à une particule (Medema *et al.*, 1998). Les étapes de coagulation et de floculation viennent donc

agglomérer les oocystes à d'autres particules, naturelles ou ajoutées, créant ainsi des amas plus denses pouvant sédimenter. Les sels de fer et d'aluminium sont les coagulants les plus utilisés (Betancourt and Rose, 2004) et sous des conditions optimales de coagulation (pH et dosage), des enlèvements de 2 log ont pu être obtenus (LeChevallier and Au, 2004).

L'étape suivante de l'enlèvement physique des oocystes est la filtration. Le type le plus populaire est la filtration granulaire et il est noté que, combiné à une étape de coagulation-floculation-sédimentation optimale, jusqu'à 4 log d'enlèvement peuvent être atteints (LeChevallier and Au, 2004) mais le USEPA leur octroie 3 log d'enlèvement (Fayer and Xiao, 2007). D'autres catégories de filtration peuvent être disponibles telles que la filtration directe et la filtration lente sur sable avec des crédits de respectivement 2.5 et de 3.0 log d'enlèvement. Les particules en suspension y sont enlevées par des mécanismes physiques de filtration, d'adsorption, de sédimentation, de coagulation et par des interactions biologiques (Betancourt and Rose, 2004).

Comme la performance de tout système en continu fluctue dans le temps, l'approche multi barrières est de mise (Desjardins, 1997; LeChevallier and Au, 2004). L'ajout d'une étape de désinfection efficace auprès des oocystes vient donc en complément. La populaire chloration n'affecte pas, dans les CT<sup>2</sup> utilisées en eau potable, la survie des oocystes (Korich *et al.*, 1990) mais les procédés efficaces contre le résistant *Cryptosporidium* sont l'exposition aux rayons ultra-violet (UV) et le traitement à l'ozone en eau chaude. Concernant les rayons UV, en eau filtrée, près de 4 log d'inactivation ont été rapportés avec une dose de 50 mJ.cm<sup>-2</sup> (Bukhari *et al.*, 1999). L'équipe de Clancy (2004) a testé quatre différentes souches de *C. parvum* à des dosages variant de 2 à 40 mJ.cm<sup>-2</sup> et a observé de 3 à 6 log d'abattement dans de l'eau déionisée. L'abattement de *C. hominis* est comparable à celui de *C. parvum* (Johnson *et al.*, 2005). Actuellement, l'US EPA octroie 3 log de crédit d'inactivation pour une dose de 12 mJ.cm<sup>-2</sup> (USEPA, 2006c). À propos de l'ozone, il est intéressant de noter qu'à ce jour, il n'y a pas de CT accepté pour la désinfection de *Cryptosporidium* particulièrement en eaux froides (LeChevallier and Au, 2004) ceci étant lié à ce que l'efficacité de ce type de désinfectant varie grandement en

---

<sup>2</sup> CT : expression de la mesure du niveau de désinfection d'un produit chimique en Concentration•Temps d'exposition (mg.min.L<sup>-1</sup>)

fonction de la turbidité, de l'alcalinité, du pH et de la température. Environ 2 log d'inactivation peuvent être atteint avec des doses de 4.6 mg min L<sup>-1</sup> à 22°C mais il faut une dose 10 fois plus élevée pour le même rendement à 1°C lors d'analyses *in vivo* menées dans une eau tamponnée aux phosphates (Li *et al.*, 2001). L'utilisation de l'ozonation pour inactiver *Cryptosporidium* dans les pays nordiques s'en trouve donc fortement compromise.

## **2.2 Méthodes de détection**

Jusqu'à maintenant, la majorité des méthodes de détection de *Cryptosporidium* ont été développées pour l'analyse des eaux de surfaces, plus précisément dans les eaux brutes de stations de production d'eau potable. Cependant, quelques études se penchent sur le développement de méthodes dans des matrices plus complexes, telles que les fèces fraîches, les fumiers (Atwill *et al.*, 2006a; Davies *et al.*, 2003) et les eaux usées (McCuin and Clancy, 2005; Robertson *et al.*, 2000; Rose *et al.*, 2004).

De manière générale, il est possible de diviser la détection de *Cryptosporidium* en trois grandes étapes : la concentration, l'isolation (ou purification) et finalement la détection. Les deux premières étapes sont les plus sensibles aux matrices environnementales complexes et hétérogènes et donc les plus critiques sur la reproductibilité des résultats. Elles offrent classiquement une plage étendue de taux de récupération (Connell *et al.*, 2000).

### **2.2.1 Concentration et isolation d'échantillons environnementaux**

L'échantillonnage des oocystes provenant d'eaux naturelles doit être sensible, car quelques oocystes peuvent engendrer la maladie (DuPont *et al.*, 1995; Chappell *et al.*, 2006). Il faut donc s'assurer de concentrer un volume significatif d'eau, d'utiliser une technique de purification discriminant bien les oocystes des débris et ainsi, obtenir une bonne récupération. Il existe principalement trois grandes approches méthodologiques pour arriver à concentrer de grands volumes soit la filtration, la centrifugation et la floculation, et deux pour isoler les oocystes soit la flottaison et la séparation par billes immunomagnétique (IMS).

### 2.2.1.1 La filtration

Les technologies de filtration ont été récemment développées pour les eaux de surfaces et les eaux traitées (DWI, 2005; USEPA, 2005) et elles représentent le nombre d'analyses de parasites le plus important recensé (Connell *et al.*, 2000; DWI, 2005; USEPA, 2006b). Les modules reconnus par le US EPA de porosité de 1  $\mu\text{m}$ , Envirochek® (Pall Corp.) et Filt-Max ® (IDEXX), ont aussi été appliqués pour les eaux usées même si de faibles volumes y sont filtrés (Gennaccaro *et al.*, 2003; Harwood *et al.*, 2005). La technique de filtration précédemment reconnue par le Information Collection Rule du US EPA (ICR) est la filtration sur fil enroulé (1  $\mu\text{m}$ , yarn-wound) (USEPA, 1996), aussi développée pour les eaux souterraines, de surfaces et traitées. Les études faites à partir de ce procédé ont révélées qu'il laisse passer des oocystes au travers de ses mailles (McCuin and Clancy, 2005) et que la turbidité, l'argile, les algues et les coagulants créent d'importantes interférences (USEPA, 1996).

### 2.2.1.2 La centrifugation

La centrifugation devient utile pour concentrer des matrices fortement chargées qui risqueraient de bloquer les coûteux filtres après seulement quelques litres. Pour les eaux usées, l'échantillonnage instantané (grab sampling) suivi d'une centrifugation est populaire (McCuin and Clancy, 2006; Robertson *et al.*, 2006). Cette technique s'est d'ailleurs montrée supérieure à la filtration par fil enroulé (yarn-wound) pour les eaux usées (Robertson *et al.*, 2000; Wallis *et al.*, 1996), requérant moins de manipulations, ce qui contribue à diminuer les pertes d'oocystes.

### 2.2.1.3 La floculation

La floculation avec différents composés (carbonate de calcium, sulfate ferrique, sulfate d'aluminium) produit un précipité dense et stable (Stanfield *et al.*, 2000) qui peut-être dissous par un traitement acide (Compagnon *et al.*, 1999). La floculation est une méthode simple et reproductible mais limitée lorsque la turbidité de l'eau est plus élevée, ce qui restreint son application pour des eaux brutes. De bons taux de récupération, autour de 70%, ont été observés (Shepherd et Wyn-Jones, 1996; Stanfield *et al.*, 2000). Dans les filières de traitement d'eau, il est

possible d'utiliser les produits de floculation ayant décanté comme concentré de microorganismes (Labbé *et al.*, 2007).

#### **2.2.1.4 La flottaison**

La flottation tire profit des différences de densité entre les oocystes et les débris en les séparant par une centrifugation dans un gradient de densité ou dans deux solutions de densités spécifiques (p. ex. : Percoll-Sucrose). Cette méthode bon marché est longue et délicate et la récupération insatisfaisante (Di Giovanni *et al.*, 1999).

#### **2.2.1.5 La séparation par billes immunomagnétiques (IMS)**

L'IMS est une technique simple qui utilise un anticorps couplé à une bille magnétique. L'anticorps se lie spécifiquement à l'oocyste et le magnétisme est exploité pour la récupération via un aimant. Cette méthode, plus coûteuse, permet aussi de séparer les oocystes des débris et de faire des changements de tampon. De plus, la turbidité de l'échantillon ne semble pas trop limiter sa performance (Rochelle *et al.*, 1999). Le DWI et l'US EPA recommandent cette technique dans leur protocole de détection standardisé pour les eaux traitées et de surface (DWI, 2005; USEPA, 2005e). Pour les eaux usées, cette technique s'est aussi popularisée (McCuin and Clancy, 2005) et élimine mieux les débris que la flottation (Huffman *et al.*, 2004). Cependant, certains auteurs notent que des facteurs tels que le pH, le type de turbidité et la présence de cations divalents peuvent affecter ses performances (Fayer and Xiao, 2007).

### **2.2.2 Méthodes de dénombrement : un choix selon l'objectif**

Afin de soutenir la discussion sur les méthodes, voici une précision de quelques termes clés :

**Compte total :** correspond au dénombrement de tous les oocystes observés, sans distinguer s'ils contiennent ou non des sporozoïdes.

**Compte viable :** signifie une énumération des oocystes qui présentent des caractéristiques suggérant un développement normal et la capacité de générer une infection. Les caractéristiques retenues varient largement et comprennent : l'intégrité membranaire de l'oocyste, l'intégrité nucléaire, la présence d'ADN-ARN, le compte des sporozoïdes, l'activité biochimique de ses ribosomes ou de ses ATPases, etc.



**Compte infectieux :** désigne le nombre d’oocystes capables de produire une infection chez son hôte et d’avoir le potentiel de s’y reproduire. Il est à noter que cette caractéristique n’indique pas que l’hôte sera malade, il peut être un porteur sain.

Les textes suivants présentent les types de méthodes suggérées selon l’objectif visé. Le tableau 2.2 résume les différentes techniques appliquées pour la détection des oocystes de *Cryptosporidium* et leurs caractéristiques.

### 2.2.2.1 Dénombrement environnemental

La technique de l’US EPA 1622-3 est l’option largement employée et reconnue pour effectuer des comptes totaux (Figure 2.2). Comme c’est une méthode standardisée, il est assez facile de se procurer le matériel adéquat, de la mettre sur pied et de comparer les résultats obtenus avec ceux produits par d’autres groupes de recherche. Cependant, le recours à des analystes expérimentés importe car cette méthode requière l’interprétation d’importantes interférences microscopiques. Elle est de plus, généralement réalisée conjointement avec la détection des kystes de *Giardia*. Pour les eaux de surface, une moyenne de récupération de  $43\% \pm 47\%$  ( $n=430$ ) a été enregistrée lors de la vaste campagne de l’ICRSS (Connell *et al.*, 2000) et pour les eaux traitées, de  $71\% \pm 13$  ( $n=10$ ) (Johnson *et al.*, 2010). De plus, l’observation des structures internes par microscopie en contraste différencié d’interférences (DIC) et des noyaux par DAPI (Figure 2.2) suggère une certaine viabilité aux oocystes mais rappelons qu’elle sous estime significativement les tests d’infectivité fait sur des animaux (Black *et al.*, 1996; Bukhari *et al.*, 2000) et ne tient pas compte de la compatibilité avec un hôte donné.

À partir des lames résultantes de la méthode US EPA 1623, plusieurs techniques de génotypage ont vu le jour (Nichols *et al.*, 2006; Ruecker *et al.*, 2005), donnant une valeur ajoutée aux comptes totaux pour des études portant sur les sources de contamination et sur le risque encouru.

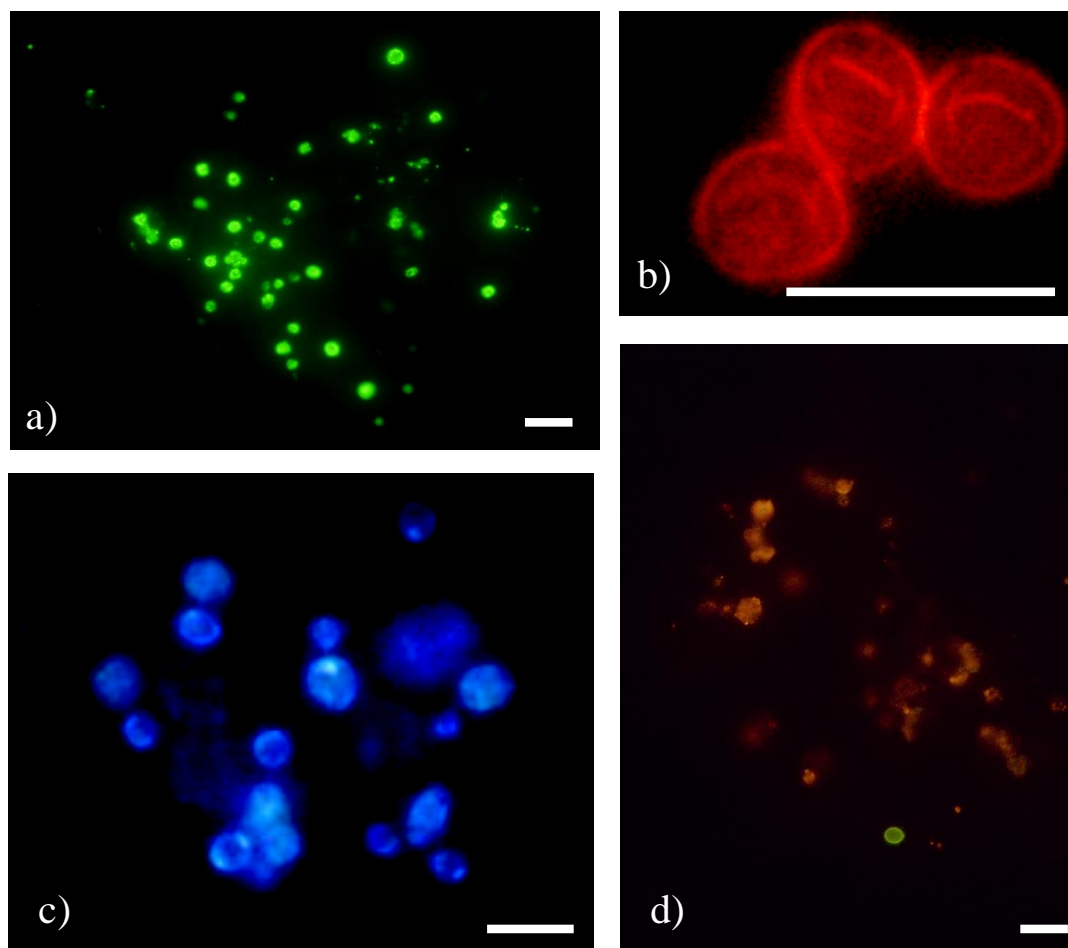


Figure 2.2: Observations microscopiques de *Cryptosporidium* de a) un foyer infectieux marqué au FITC, b) trois oocystes marqués au CY3, c) groupe d'oocystes marqués au DAPI et d) combinaison de foyer (CY3) et d'un oocyste (FITC). Les marqueurs blancs sont d'environ 10 µm.

Tableau 2.2: Résumé des différentes méthodes de détection des oocystes de *Cryptosporidium* ssp et leurs applications.

Méthode	Description	Réponse apportée	Utilité	Inconvénient	Références
<b>DAPI/PI</b> 4',6-diamidino-2-phenylindole et Iodure de propidium	Test la présence d'acide nucléique (DAPI) et l'intégrité membranaire (exclusion PI).	Total Viabilité	-Complément de viabilité au dénombrement environnemental -Compte de solution purifiée	-Non-spécifique -Viabilité discutable	(Campbell <i>et al.</i> , 1992)
<b>FISH</b> Hybridation fluorescente <i>In Situ</i>	Oligonucléotide d'ADN fluoro-marqué ayant une séquence complémentaire à l'ARNr de l'espèce recherchée.	Viabilité Spéciation	-Semi-quantification -Identification environnemental multiple -Recherche de la source de contamination	Forte charge de développement et de travail	(Amann <i>et al.</i> , 1995; Deere <i>et al.</i> , 1998; Lemos <i>et al.</i> , 2005)
<b>Excystation</b>	En présence d'agents de stimulation, mesure la capacité des sporozoïdes à sortir de l'oocyste.	Viabilité	Analyse de survie	Surestime les tests in vitro d'environ 100X (Betancourt et Rose, 2004)	(Campbell <i>et al.</i> , 1992; Feng <i>et al.</i> , 2006; Freire-Santos <i>et al.</i> , 2000; Smith <i>et al.</i> , 2005)
<b>USEPA ICR</b>	Anciennement recommandée comme standard par USEPA. Concentration : filtre « filé » (yarn-wound) ; isolation : gradient Percoll-Sucrose ; détection : immunofluorescence.	Total	Dénombrement environnemental	-Varie beaucoup selon la turbidité -Faux négatif	(USEPA, 1996)
<b>USEPA 1622/3<sup>a)</sup></b>	Méthode environnementale présentement standardisée et recommandée; concentration : filtration; isolation : immuno magnétique; détection : immuno fluorescente, DAPI et description morphologique.	Total Viabilité	Standard international de dénombrement environnemental	Interférences (algues, levures)	(USEPA, 2005b)

Tableau 2.2: Résumé des différentes méthodes de détection des oocystes de *Cryptosporidium* ssp et leurs applications (suite).

Méthode	Description	Réponse apportée	Utilité	Inconvénient	Références
<b>USEPA 1622/3<sup>a)</sup>-PCR-RFLP</b>	À partir de la lame comptée de 1622(3), récupération des oocystes, extraction des acides nucléiques pour une amplification et une détection par polymorphisme de taille des fragments de restriction.	Total Viabilité Spéciation	-Dénombrement environnemental -Recherche de la source de contamination -Risque relatif	-Manipulation délicate de récupération surtout si faible concentration	(Nichols <i>et al.</i> , 2006; Ruecker <i>et al.</i> , 2005)
<b>USEPA 1622/3<sup>a)</sup>-qPCR</b>	-Extraction d'ADN sur les lames de la méthode 1623 -Amplification multiplex (HSP 70 et 18S RNA genes -Génotypage par <i>analyse de dénaturation haute résolution</i> (HRMA)	Total Viabilité Spéciation	-Dénombrement environnemental -Recherche de la source de contamination -Risque relatif	-Manipulation délicate de récupération surtout si faible concentration	(Di Giovanni <i>et al.</i> , 2010)
<b>qPCR</b> PCR en temps réel	Méthode de PCR semi-quantitative permettant l'identification de ou des espèces.	Spéciation	-Dénombrement relatif environnemental -Recherche de la source de contamination -Risque	-Permet difficilement de quantifier de faible quantité -Inhibiteurs présents dans échantillons environnementaux	(Limor <i>et al.</i> , 2002; Monis and Giglio, 2006; Monis <i>et al.</i> , 2005)
<b>PCR-RFLP</b>	PCR suivit d'une détection par polymorphisme de taille des fragments de restriction.	Spéciation	-Recherche de la source de contamination -Absence ou présence environnementale	-Interfère avec dynoflagellés -Inhibiteurs présents dans échantillons environnementaux	(Quintero-Betancourt <i>et al.</i> , 2003; Sturbaum <i>et al.</i> , 2002)

Tableau 2.2: Résumé des différentes méthodes de détection des oocystes de *Cryptosporidium* ssp et leurs applications (suite).

Méthode	Description	Réponse apportée	Utilité	Inconvénient	Références
<b>RT-PCR</b> Reverse Transcriptase	Test d'activité biochimique amplifiant et détectant un ARNm.	Viabilité	-Analyse de désinfection -Présence semi-quantitative	-ARN se dégrade facilement -Inhibiteurs présents dans échantillons environnementaux	(Jenkins <i>et al.</i> , 2000; Hallier-Soulier et Guillot, 2003)
<b>CC-RT-PCR</b> Culture Cellulaire	Oocystes purifiés inoculés sur des cellules intestinales en culture. Détection des foyers infectieux par RT-PCR.	Infectiosité	-Analyse de désinfection -Semi-quantitatif -Dénombrement environnemental -Analyse de risque	-Ne donne pas le compte total pour estimer le % d'infectivité -Faiblement reproductible car les foyers et leur ARNm sont présents de manière inégale	(Di Giovanni <i>et al.</i> , 1999; Johnson <i>et al.</i> , 2010)
<b>CC-qPCR</b>	Oocyste purifié inoculé sur des cellules intestinales en culture. Détection et spéciation des foyers infectieux par qPCR	Spéciation Infectiosité semi-quantitative	-Analyse de désinfection -Dénombrement environnemental -Recherche de la source de contamination -Analyse de risque	-Ne donne pas le compte total pour estimer le pourcentage d'infectivité -Semi-quantitatif pour les faibles concentrations -Faux-positif	(Di Giovanni and LeChevallier, 2005; Johnson <i>et al.</i> , 2010)
<b>CC-IFA</b>	Oocyste purifié inoculé sur des cellules intestinales en culture. Détection des foyers infectieux par immunofluorescence	Infectiosité	-Analyse de désinfection -Dénombrement environnemental -Analyse de risque	-Ne donne pas le compte total pour estimer le pourcentage d'infectieux -Ne donne pas l'espèce	(Johnson <i>et al.</i> , 2010; Slifko <i>et al.</i> , 1997)
<b>In vivo : Animaux et Humain</b>	Oocyste purifié inoculé dans des cobayes (p.ex. souris). Détection de la multiplication des oocystes dans les fèces ou dissection du tube digestif	Infectiosité	-Analyse d'infectiosité des souches -Analyse désinfection (MPNb)	-Variabilité inter espèces -Semi-quantitatif -Difficilement applicable en environnement	(Chappell <i>et al.</i> , 2006; DuPont <i>et al.</i> , 1995; Rochelle <i>et al.</i> , 2002)

### 2.2.2.1 Analyses de désinfection

Pour des analyses de désinfection, les méthodes de mesure d'infectiosité sont préférables car elles incluent la mise en culture des oocystes sur un tapis cellulaire reproduisant le système digestif et elles produisent des résultats hautement corrélés à ceux de tests animaux ( $r=0.89$  avec des souris) (Bukhari *et al.*, 2000; Rochelle *et al.*, 2002; Slifko *et al.*, 2002). Aussi, les méthodes utilisant une détection par immunofluorescence (Figure 2.2) offrent un compte plus précis que les méthodes par PCR (Johnson *et al.*, 2007). Afin d'augmenter la précision de la fraction infectieuse calculée dans une analyse, la méthode qui fût développée dans le cadre du présent projet, la Détection Double et Directe sur Culture Cellulaire avec Analyse par Immunofluorescence 3D-CC-IFA (Figure 4.1), vient offrir la détection simultanée des comptes total et infectieux d'un même échantillon.

### 2.2.2.2 Source de contamination

Une technique de détection permettant la spéciation s'impose afin de connaître le ou les espèces d'oocystes récupérés et de possiblement de corrélérer ce résultat à l'origine suspectée. La plupart des techniques de PCR le permettent, considérant que le séquençage des fragments amplifiés est aisé et peu coûteux. Si cette étape pose trop de problèmes (transport d'échantillons à l'extérieur), les techniques de PCR-RFLP et de qPCR (HMRA) peuvent être utilisées. Il est à noter que ces dernières requièrent une librairie préexistante. Les gènes les plus communs amplifiés sont ceux de l'ARNr 18S, du *Cryptosporidium* Oocyst Wall Protein (COWP), de l'antigène de surface GP60 et le Heat Shock Protein 70 (HSP70) (Di Giovanni *et al.*, 1999; Plutzer and Karanis, 2007; Ruecker *et al.*, 2005; Zhou *et al.*, 2004a). Le plus recommandé est le gène de l'ARNr 18S mais un minimum de deux locis est suggéré pour une identification robuste, tel que le gène de HSP70 (Cacciò *et al.*, 2005).

### 2.2.2.3 Analyse de risque

Finalement, les techniques à exploiter ici sont celles qui à la fois sélectionnent les espèces compatibles à l'humain et qui prennent en compte la survie de l'oocyste dans l'environnement. Les méthodes basées sur l'inoculation des oocystes sur des cellules en culture (CC) sont à privilégier, car elles visent à reproduire le système digestif de l'hôte et se sont révélées représentatives des modèles animaux (Rochelle *et al.*, 2002). Ces techniques *in vivo* répondent

aux critères de sélection des espèces pouvant infecter les humains (Johnson *et al.*, 2005; Schets *et al.*, 2005; Xiao *et al.*, 2004) et de survie aux stress environnementaux (Gennaccaro *et al.*, 2003; Rose *et al.*, 2004). Il est cependant important de noter qu'un foyer infectieux en culture n'est pas garant que l'oocyste sera capable d'engendrer la maladie chez son hôte mais suggère une capacité à s'y reproduire. L'ajout d'une étape de spéciation peut aussi aider à identifier l'origine du risque et son importance, considérant que toutes les souches ne sont pas d'égal danger.

Même avec un contrôle de la qualité serré, la détection d'oocystes de *Cryptosporidium* dans des échantillons environnementaux demeure délicate. Les taux de récupération et les limites de détections apportent beaucoup d'incertitude. De plus, comme la prévalence de ce protozoaire est généralement faible et variable, la fréquence d'observation aura de fortes variabilités même en ayant une méthode de détection hautement spécifique et de bonne sensibilité.

## **2.3 Occurrence des oocystes de *Cryptosporidium***

La possible présence des oocystes de *Cryptosporidium* dans des environnements aussi variés que les milieux forestiers, ruraux et urbains est chose globalement acceptée. La grande diversité des espèces et génotypes infectants des hôtes spécifiques et multiples n'est pas étrangère à cette omni présence. Des oies aux reptiles, en passant par le dugong et le kangourou, le genre *Cryptosporidium* a su s'adapter (Graczyk *et al.*, 1998; Xiao *et al.*, 2004; Zhou *et al.*, 2004b). Quoi que toutes les espèces d'oocystes ne soient pas infectieuses pour l'humain, la détection de *Cryptosporidium* se fait généralement sur la base de comptes totaux d'oocystes, sans discrimination pour les espèces et génotypes ainsi que leur survie. Voici donc un tour d'horizon de la présence des oocystes de *Cryptosporidium* de sources diverses affectant les eaux de surface de différents milieux.

### **2.3.1 Milieu forestier**

Les sources de pollution fécale provenant de la faune en milieu forestier sont considérées comme diffuses (non point sources) et atteignent les eaux de surface soit par contact direct soit par le lessivage des sols (USEPA, 2010). Par exemples, les bernaches du Canada se sont révélées

Tableau 2.3: Revue d'études documentant la présence d'oocystes infectieux dans l'environnement telle que déterminée par des méthodes en culture cellulaire

Matrice	Méthode; Compte; % Récupération			Références
	Total	Infectieux	Espèce	
Eaux de surface	Flottation-IFA; 14 positifs / 122 échant.	IMS-CC-PCR; 6 positifs / 122 échant.	<i>C. parvum</i> de différents génotypes	(Di Giovanni <i>et al.</i> , 1999)
	USEPA 1623; 60 positifs / 533 tests; 5.9-110.2%	CC-PCR; 22 positifs / 560 tests ; 37.3-79%	Major. <i>C. parvum</i>	(LeChevallier <i>et al.</i> , 2003)
	Enviro-IMS-IF; 10-130 oocystes / 100L	CC-IFA; 3 positifs / 15 tests	ND	(Schets <i>et al.</i> , 2005)
Eaux usées affluents	USEPA 1623; <5.6-26 300 / 100L 14 positifs / 18 tests	CC-FDM-MPN 36.8-5 065 / 100L 6 positifs / 18 tests	<i>C. parvum</i>	(Gennaccaro <i>et al.</i> , 2003)
Eaux usées effluents secondaires	USEPA 1623 <12.8-345 / 100L 15 positifs / 18 tests	CC-FDM-MPN <2.5-106 / 100L 7 positifs / 18 tests	<i>C. parvum</i>	(Gennaccaro <i>et al.</i> , 2003)
Eaux usées effluents tertiaires	USEPA 1623 <1.8-178 / 100L 10 positifs / 15 tests	CC-FDM-MPN <1-27 / 100L 6 positifs / 15 tests	<i>C. parvum</i>	(Gennaccaro <i>et al.</i> , 2003)



Tableau 2.3: Revue d'études documentant la présence d'oocystes infectieux dans l'environnement telle que déterminée par des méthodes en culture cellulaire (suite).

Matrice	Méthode; Compte; % Récupération			Références
	Total	Infectieux	Espèces	
<b>Eaux usées effluents tertiaires</b>	USEPA 1623 6-319 / 100L; 5-31%	CC-FDM-MPN <1.3-18 / 100L	<i>C. parvum</i> génotype human et bovin	(Quintero-Betancourt <i>et al.</i> , 2003)
<b>Eau traité</b>	-	IMS-CC-PCR; 22 usines positives / 82 testées ou 1.4% des échantillons testés	<i>C. parvum</i> 23/24 <i>C. hominis</i> 1/24	(Aboytes <i>et al.</i> , 2004)
	-	CC-IFA 0/350 000L 370 échantillons 14 usines	-	(Johnson <i>et al.</i> , 2010)

infectées par *C. parvum* au Maryland (Graczyk 1998), ainsi que des animaux terrestres tels que le chevreuil, le tamia, la souris, la mouffette, le raton-laveur et le rat musqués dans l'état de New York (Perz 2001). Cependant, un autre étude génotypant des isolats d'oocystes provenant d'eau de surface d'un bassin-versant protégé de l'état de New York a révélé qu'ils provenaient principalement d'espèces spécifiques à la faune et n'étaient pas un risque pour l'humain (Jiang *et al.*, 2005b). Près de Vancouver (CB), une moyenne de 0.15 oocystes L<sup>-1</sup> fût notée dans une zone forestière (Isaac-Renton *et al.*, 2005). Finalement, Kistemann *et al.* (2002) ont échantillonné des eaux de surface d'un site presque exclusivement forestier et ont identifié une moyenne de 0.07 oocystes L<sup>-1</sup> en période normale et de 0.15 oocystes L<sup>-1</sup> lors d'évènements de pluie.

### 2.3.2 Milieu urbain

Au niveau du milieu urbain, les principales sources de pollution fécale sont bien entendu les humains mais aussi la faune habitant les villes ainsi que les animaux de compagnie. Les sources de pollution des eaux de surfaces de type ponctuel (point source) sont les CSO (eaux usées combinées de surverse), les dérivations d'eaux usées brutes et les rejets d'eaux usées traitées et de type diffus comme le lessivage des sols (USEPA, 2010). Au niveau des eaux usées brutes, pouvant être dérivées directement dans le milieu récepteur, les concentrations d'oocystes varient de <LD à 24 000 oocystes L<sup>-1</sup> en pays développés, avec des prévalences de 30-100% selon l'étude (Lemarchand and Lebaron, 2003; McCuin and Clancy, 2006; Montemayor *et al.*, 2005; Robertson *et al.*, 2006; Robertson *et al.*, 2000). Une étude rapporte des concentrations de foyers infectieux allant de 0.37 à 51 par litre et le génotype identifié fût *C. parvum* (Tableau 2.3) (Gennaccaro *et al.*, 2003). Un second type de rejet d'eaux usées non traitées mais diluées par les eaux de pluie, sont les surverses d'égouts pluviaux et sanitaires combinés (CSO). Quelques études rapportent des concentrations allant de <LD à 400 oocystes L<sup>-1</sup> et de forte prévalence, de 80 à 100% (Gibson III *et al.*, 1998; States *et al.*, 1997; Xiao *et al.*, 2000). *C. baileyi*, *C. snake* et *C. opossums* y ont été détectées (Xiao *et al.*, 2000). Les eaux usées traitées rejettent aussi une grande quantité d'oocystes allant de <LD à 44 500 oocystes L<sup>-1</sup> avec des prévalences de 19 à 100% pour des traitements secondaires et tertiaires (Charles *et al.*, 2003; Huffman *et al.*, 2006; Lemarchand and Lebaron, 2003; McCuin and Clancy, 2006; Montemayor *et al.*, 2005; Quintero-Betancourt *et al.*, 2003; Robertson *et al.*, 2006; Robertson *et al.*, 2000; States *et al.*, 1997). Les

concentrations de foyers infectieux notées dans la littérature varient de 0 à 1 foyer L<sup>-1</sup> et l'espèce identifiée est *C. parvum* (Tableau 2.3) (Gennaccaro *et al.*, 2003; Quintero-Betancourt *et al.*, 2003).

### 2.3.3 Milieu rural

Concernant les sources de pollutions en milieu rural ou agricole, les animaux d'élevage, la faune et les humains servent d'émetteurs d'oocystes. Seront ici traités les animaux d'élevage, car ils représentent la densité d'excrétion la plus élevée dans ce type d'environnement. Les oocystes atteignent les cours d'eau soit par contact direct, soit par le lessivage des sols servant à l'épandage ou encore, par le rejet de traitement d'eaux usées agricoles. Les fermes d'engraissement intensif d'animaux sont considérées comme des sources de pollution ponctuelle tandis que les animaux d'élevage et de compagnie, le lessivage des sols et les systèmes septiques sont des sources diffuses (USEPA, 2010). Les animaux de fermes pouvant être infectés par une ou des espèces d'oocystes sont nombreux. D'abord, il est intéressant de noter que 88.7% des fermes laitières québécoises ont été décrites comme positives aux oocystes (Ruest *et al.*, 1998). Les veaux sont reconnus pour contenir de 54 à 10<sup>7</sup> oocystes g<sup>-1</sup> de fèces avec une vaste gamme de prévalence, de 2.4 à 80% (Coklin *et al.*, 2007; Fayer *et al.*, 1998; Huetink *et al.*, 2001; Maddox-Hyttel *et al.*, 2006; Mendonca *et al.*, 2007; Olson *et al.*, 1997; Starkey *et al.*, 2005; Wade *et al.*, 2000) tandis que les vaches ont une prévalence de 0 à 100% (Coklin *et al.*, 2007; Huetink *et al.*, 2001; Maddox-Hyttel *et al.*, 2006; Mendonca *et al.*, 2007; Olson *et al.*, 1997; Wade *et al.*, 2000). Les élevages de porc au Québec auraient une faible prévalence d'oocystes avec 1 établissement positif sur 32 testées (Côté *et al.*, 2006). Au Canada, une étude rapporte que quatre productions porcines sur six sont positives et 11% des animaux testés (Olson *et al.*, 1997). L'animal le plus reconnu comme étant porteur du génotype zoonotique de *Cryptosporidium*, c'est-à-dire *C. parvum*, est le veau (Coklin *et al.*, 2007; Fayer *et al.*, 1998; Fayer and Xiao, 2007; Olson *et al.*, 1997; Santin *et al.*, 2004; Xiao *et al.*, 2004). À propos des eaux de surface étant influencées par la pollution rurale, des concentrations moyennes de 0.15 oocystes L<sup>-1</sup> sont recensées (Isaac-Renton *et al.*, 2005), mais l'espèce la plus commune est spécifique aux bovins, *C. andersoni* (Ruecker *et al.*, 2007).

### 2.3.4 Eaux de surfaces en milieux mixtes

Rares sont les études qu'ont été conduites sur une eau de surface strictement rurale ou urbaine, la plupart des écosystèmes étant mixtes. Près de nous, une vaste étude québécoise note de 0.15 à 5 oocystes L<sup>-1</sup> (Payment *et al.*, 2000) tandis qu'une étude pancanadienne portant sur 72 municipalités rapporte 53 analyses positives sur 1 173 eaux testées (Wallis *et al.*, 1996). Une étude américaine exhaustive de près de 6 000 tests sur des eaux brutes de station de production d'eau potable a obtenu une moyenne de 0.067 oocystes L<sup>-1</sup> et une prévalence de 6.8% (McGuire *et al.*, 2002).

### 2.3.5 Eaux traitées pour la consommation

Quelques courageux chercheurs ont effectué des études sur l'eau traitée. D'abord, Wallis *et al.* (1996) ont trouvé 15 échantillons positifs sur 423 tests répartis dans 72 municipalités canadiennes. Cependant, l'étude qui a ébranlé le monde des traiteurs d'eau a été menée aux États-Unis où 22 usines sur 82 ont testés positives par CC-PCR. En fait, 1.4% des échantillons testés étaient positifs, avec principalement *C. parvum* comme coupable (un échantillon de *C. hominis*). Ces données suggéraient un risque excédentaire d'infection de 52/10 000, ce qui est au-dessus du < 1/10 000 normalement visé en santé publique (Aboytes *et al.*, 2004). Suite à cette étude, une vaste campagne a vu le jour et 370 échantillons de près de 1000 L chacun ont été analysés (Tableau 2.3). Aucun échantillon positif en CC-IFA n'a été trouvé (Johnson *et al.*, 2010).

## 2.4 Indicateurs et *Cryptosporidium*

Depuis plus d'un siècle, les autorités de santé publique tâchent de chercher des indices permettant d'identifier efficacement la présence de microorganismes pathogènes dans les eaux de consommation. Le tout débuta en 1891, lorsque The Franklands reconnurent l'eau comme une cause de maladie et que les gens malades excrètent des organismes pathogènes en même temps que leur flore normale. Donc, des microorganismes caractéristiques d'eaux usées devraient être identifiés. Un an plus tard, l'australien Schardinger suggéra *E. coli* (Tallon *et al.*, 2005). Cette bactérie,

présente dans la flore normale des animaux à sang chaud, est encore aujourd'hui recommandée comme le meilleur indicateur de contamination fécale (Ashbolt *et al.*, 2001).

Les indicateurs de contamination fécale se veulent donc être une alternative pratique pour détecter globalement la présence de microorganismes pathogènes fécaux. Leur mesure doit être efficace, facile et abordable. Un bon indicateur de contamination fécale devrait être corrélé au risque sanitaire encouru, à la présence ainsi qu'à la concentration, à la survie et au transport dans l'environnement et en usine des pathogènes qui lui sont associés.

### **2.4.1 En milieu urbain**

Au niveau des STEP, la concentration, l'enlèvement et les événements de pointe de *Cryptosporidium* ont été reliés avec plus ou moins de succès aux concentrations de divers microorganismes. Dans les eaux brutes, *E. coli*, *Enterococci*, les streptocoques fécaux et les coliformes totaux ont été corrélés avec les dénombrements d'oocystes de *Cryptosporidium* (Reinoso *et al.*, 2008; Wohlsen *et al.*, 2006) alors que Reinoso *et al.*, (2008) corréle les oocystes avec *E. coli*, les streptocoques fécaux et les coliformes totaux. Cependant, au niveau des effluents d'usines, aucune corrélation n'a pu être établie pour *E. coli* et *Enterococci* (Wohlsen *et al.*, 2006). Concernant les enlèvements, une étude effectuée dans six stations ayant des traitements tertiaires n'a rapporté aucune corrélation entre les oocystes et *C. perfringens*, *Enterococci*, les coliformes totaux et fécaux, les virus entériques et les phages (Rose *et al.*, 2004). Finalement, Gibson *et al.*, (1998) a analysé les CSO et n'a pas trouvé de lien entre la présence de *Cryptosporidium* et les coliformes fécaux lors d'évènements de pluie. Des différences au niveau de la morphologie et de la résistance existent entre tous ces microorganismes, engendrant des comportements différents en réseau et en station. Par exemple, les entérocoques sont plus résistants que les coliformes fécaux dans les STEP (Rose *et al.*, 2004).

### **2.4.2 En milieu rural**

Concernant la présence d'oocystes dans les cours d'eau agricole, il est intéressant de premièrement considérer les différents comportements de transport de microorganisme via le

lessivage des sols. Une étude récente a fait le suivi d'événements de pluie extrême et leurs impacts sur les concentrations de *E. coli* et d'*Enterococci* dans le cours d'eau. Les résultats ont démontré la présence d'entérocoques dans le premier flux, alors que *E. coli* était présent pendant tout l'évènement (Cinque and Jayasuriya, 2010). Ceci suggère un réservoir de *E. coli* important par rapport aux entérocoques. Aussi, Sisco *et al.*, (2000) ont noté une diminution de la quantité d'oocystes après cinq jours de pluies consécutives. Au-delà des quantités disponibles variables des microorganismes sur les sols, leurs modes de transport viennent aussi influencer leur présence dans le cours d'eau. Une analyse factorielle a démontré que l'érosion du sol ainsi que le lessivage sont associés à *C. perfringens* et aux entérocoques. Les auteurs suggèrent qu'ils sont possiblement attachés aux particules du sol ou qu'ils se comportent de la même manière (Cinque and Jayasuriya, 2010). Au niveau des eaux de surface agricole, une étude albertaine a observé les pointes de *E. coli* de juin à septembre tandis que les pointes de *Cryptosporidium* se situaient de mars à avril et de août à novembre (Isaac-Renton *et al.*, 2005). Selon Wilkes *et al.*, (2009), *E. coli* est le plus utile pour déterminer la présence/absence des parasites *Cryptosporidium* et *Giardia*. Selon leurs observations, plus la densité de *E. coli* est élevée, plus les probabilités de trouver des (oo)cystes augmentent. Ils qualifient *E. coli* comme étant un indicateur conservateur de la présence de *Cryptosporidium*.

### 2.4.3 En eaux de surface

Plusieurs études se sont penchées sur les liens entre la concentration ou la présence de *E. coli*, des coliformes totaux et fécaux, d'entéro et de streptocoques, de *C. perfringens*, des virus et phages ainsi que sur la turbidité et les événements de pluie et entre la concentration ou la présence de *Cryptosporidium* (Atherholt *et al.*, 1998; Ferguson *et al.*, 1996; Kistemann *et al.*, 2002; McGuire *et al.*, 2002; Payment *et al.*, 2000; Payment *et al.*, 1989; Payment and Franco, 1993; Wohlsen *et al.*, 2006). Leurs modestes et variés succès reposent sur les événements de pluie (Kistemann *et al.*, 2002; Schets *et al.*, 2008), la turbidité (Atherholt *et al.*, 1998; Ferguson *et al.*, 1996) et *C. perfringens* (Atherholt *et al.*, 1998; Payment and Franco, 1993). Il est suggéré que les indicateurs de la présence d'oocystes peuvent-être spécifiques à un bassin-versant (Chauret *et al.*, 1995; Kistemann *et al.*, 2002). Ces groupes possèdent en effet différentes caractéristiques venant

expliquer le manque fréquent de corrélation. D'abord, il faut savoir que les indicateurs sont normalement présents dans les fèces mais pas les pathogènes, ces derniers étant variables selon les cycles épidémiologiques (LeChevallier *et al.*, 2003; McLauchlin *et al.*, 2000). Aussi, plusieurs représentants du groupe des coliformes ne sont pas retrouvés de manière systématique dans les fèces (p. ex. *Klebsiella* et *Enterobacter*). De plus, *E. coli* et les entérocoques sont capables de croître dans certains environnements naturels tel que les eaux et les sols tropicaux alors que les oocystes ne peuvent se reproduire à l'extérieur d'un hôte (Ashbolt *et al.*, 2001). Dans le même ordre d'idée, les taux de mortalité varient selon les microorganismes : *E. coli* plus rapidement que les oocystes de *Cryptosporidium* qui disparaît lui-même plus rapidement que *C. parvum* (Medema *et al.*, 1997). Aussi, les entérocoques survivent plus longtemps que *E. coli* dans les eaux douces (Liu *et al.*, 2006). De manière plus pratique, une grande compilation de données prises dans les eaux brutes de station de production d'eau potable recherchait spécifiquement un indicateur commode pour les opérateurs. Ils ont établi des niveaux seuils de *E. coli* pour prédire de fortes concentrations de *Cryptosporidium* et permettre l'ajustement des niveaux de traitements (McGuire *et al.*, 2002). Ainsi, une concentration plus élevée de 10 UFC pour les eaux de lac et plus de 50 UFC pour les eaux de rivière de *E. coli* par 100 mL est considérée comme une indication que des concentrations de plus de 0.075 oocystes par litre peuvent survenir.

## **2.5 Revue critique de la littérature**

Tel que décrit précédemment, la compréhension du risque réel que posent les oocystes de *Cryptosporidium* aux prises d'eau est limitée par un certain nombre de facteurs dont l'évaluation de leurs fractions infectieuses, la connaissance de leur occurrence selon différents milieux et son manque de liens avec les indicateurs microbiens traditionnels.

### **2.5.1 Méthodes disponibles pour évaluer le risque des oocystes de *Cryptosporidium***

Au niveau méthodologique, les méthodes de mise en culture des oocystes sur des cellules intestinales humaines sont fortement corrélés à ceux d'infectivité obtenus chez les organismes vivants (Bukhari *et al.*, 2000; Rochelle *et al.*, 2002 ; Slifko *et al.*, 2002). Plusieurs variations de

ces méthodes existent (Table 4.1) mais celles où les foyers sont détectés par immunofluorescence (CC-IFA) a récemment été retenue comme la méthode de détection d'infectiosité la plus performante (Johnson *et al.*, 2010). Les travaux de validation des différentes méthodologies de détection des foyers infectieux ont démontré que la détection de leurs ADN (CC-PCR) générait de faux-positifs et que la détection de leurs ARN (CC-RT-PCR) manquait de reproductibilité (Johnson *et al.*, 2010). Pour la méthode CC-IFA, les conditions expérimentales utilisées varient grandement d'un groupe de recherche à l'autre et méritent d'être comparées et évaluées dans une logique physiologique humaine afin d'optimiser leur détection.

De façon plus importante, les valeurs de fraction infectieuses utilisées pour les analyses de risque méritent d'être mieux justifiées. La valeur utilisée par les analystes de risque de l'USEPA (USEPA, 2005a) repose premièrement sur un ratio de prévalences établi à partir de deux analyses : une première, CC-PCR, donnant le pourcentage de positif des comptes infectieux (22/560) et la seconde, méthode US EPA 1623, le pourcentage de positif des comptes totaux (60/593). Un pourcentage d'infectivité de 37% (22/60) est ainsi dégagé (LeChevallier *et al.*, 2003). L'étude souligne qu'un seul groupe d'échantillon score positif pour les deux méthodes simultanément. Cette valeur s'appuie aussi sur le nombre d'oocyste totaux contenant des structures internes de la vaste campagne du ICRSS (USEPA, 2005a). Les données de la campagne du ICRSS ne tient pas compte du génotype trouvé ni de sa survie. L'estimation proposée par LeChevallier *et al.*, (2003) est sujette à de grandes erreurs compte tenu de la faible abondance des oocystes dans l'environnement et de leur hétérogénéité.

Pour améliorer l'estimation de ce ratio, il serait souhaitable de procéder à une double détection et ainsi combiner la détection totale et infectieuse, sur le même échantillon. En effet, l'utilisation d'échantillons différents ou séparés apporte un grand biais dans la détermination de la fraction infectieuse.



### **2.5.2 Données environnementales disponibles sur la nature infectieuse des oocystes de *Cryptosporidium***

D'abord, il est à noter que la majorité des données disponibles sur l'occurrence des oocystes de *Cryptosporidium* proviennent de dénombrements totaux d'eaux de surface (Connell *et al.*, 2000; Di Giovanni *et al.*, 1999; LeChevallier *et al.*, 1991; Payment *et al.*, 2000; Ward *et al.*, 2002; Wilkes *et al.*, 2009; Wohlsen *et al.*, 2006). Rares sont les études qui procurent des estimés de comptes infectieux et les rapportent principalement sous formes de prévalence et non pas de concentrations ou de fractions (Di Giovanni *et al.*, 1999; LeChevallier *et al.*, 2003; Schets *et al.*, 2005). Les eaux de surface représentent des systèmes complexes, où se mélangent différents types de pollution fécale. Il est donc difficile de tirer des conclusions claires sur l'occurrence d'oocystes infectieux dans des systèmes car la présence d'espèces infectieuses ainsi que leur survie dépendent de leur origine (humaine ou animale) et de leur devenir dans l'environnement. Peu d'études présentent des résultats provenant des cours d'eau où seule une catégorie de pollution fécale est dominante (Isaac-Renton *et al.*, 2005; Wilkes *et al.*, 2009) et du génotypage (Ruecker *et al.*, 2007).

La méthode développée au cours de ce projet, la 3D-CC-IFA, se veut être la première à pouvoir mesurer sur un même échantillon, les comptes totaux et infectieux et ainsi dégager une fraction infectieuse. Son application à la détection d'oocystes totaux et infectieux des sources de pollution fécales rurales et urbaines vient principalement distinguer les niveaux de risque pour l'humain que pose les oocystes de *Cryptosporidium* de différentes origines, contrairement à poser directement la fraction infectieuse décrite ci-haut aux comptes totaux retrouvés en stations.

### **2.5.3 Outils prédictifs de la présence des oocystes totaux et infectieux dans les eaux de surface**

Établir la présence des oocystes de *Cryptosporidium* dans les eaux de surface demeure un important défi pour les traiteurs d'eau et la santé publique. En effet, même la méthode de référence de l'US EPA 1623 reste hors de portée budgétaire et technique pour une grande

majorité des stations de production d'eau potable. Pour la plupart, ils basent leur traitement sur une combinaison d'indicateurs tels que la turbidité et différents comptes microbiens. Cependant, ces indicateurs comportent de nombreuses limitations. La littérature établit des relations entre *Cryptosporidium* et les indicateurs aux niveaux de leurs transports, de leur survie (Gennaccaro *et al.*, 2003; Medema *et al.*, 1997), de leur occurrence générale (McGuire *et al.*, 2002), leur saisonnalité (Wilkes *et al.*, 2009) et au cours d'évènements (Kistemann *et al.*, 2002; Sicho *et al.*, 2000) ainsi que de différentes sources de pollutions fécales (Isaac-Renton *et al.*, 2005; Kistemann *et al.*, 2002). Cependant, les corrélations demeurent variables, faibles et spécifiques.

Dans cette optique, la dernière partie de cette thèse propose des modèles de charge journalière d'oocystes sécrétés par équivalents d'animaux ou d'humains. Ces modèles offrent la comparaison de la contribution en oocystes totaux et infectieux en milieux urbains et ruraux comme compléments d'information aux indicateurs traditionnels.

## **CHAPITRE 3. OBJECTIFS DE RECHERCHE ET DÉMARCHE EXPÉRIMENTALE**

### **3.1 Objectifs de recherche**

#### **3.1.1 Objectif général**

L'objectif général est de caractériser le risque sanitaire associé aux oocystes infectieux de *Cryptosporidium* dans les eaux de surfaces influencée par des sources de pollution urbaines et agricoles.

##### **3.1.1.1 Objectifs spécifiques du développement méthodologique**

Les objectifs spécifiques des travaux de développement méthodologique sont :

- optimiser le prétraitement de stimulation ainsi que le milieu d'infection de la méthode de détection par Culture Cellulaire et l'Analyse par Immunofluorescence (CC-IFA) des oocystes infectieux par une logique physiologique;
- combiner la détection totale et infectieuse des oocystes sur le même échantillon par l'amélioration de l'immunodétection des oocystes et des foyers sur les cellules en culture et par la récupération des oocystes perdus dans les eaux de lavage;
- tester les performances de récupération et du calcul d'infektivité de la nouvelle méthode par l'ajout dosé d'oocystes infectieux dans différents types d'eaux de surface.

##### **3.1.1.2 Objectifs spécifiques des campagnes d'échantillonnage des sources urbaines et rurales**

Les objectifs spécifiques des campagnes d'échantillonnage sont de :

- améliorer la concentration et l'isolation des oocystes de *Cryptosporidium* et des kystes de *Giardia* provenant de multiples matrices complexes telles que les eaux usées, les fèces fraîches, le fumier, les eaux de drainage agricole et les eaux de surface par la comparaison de différentes techniques;

- valider la méthode 3D-CC-IFA dans de multiples matrices complexes telles que les eaux usées, les fèces fraîches, le fumier, les eaux de drainage agricole et les eaux de surface par les mesures d'oocystes indigènes et d'oocystes ajoutés;
- démontrer la variabilité de l'occurrence des oocystes totaux ainsi que leurs fractions infectieuses par l'échantillonnage répétée de sources de pollution distinctes de types rurales (fèces de veau et de vache, fumier, exutoire) et urbaines (eaux usées) influençant les eaux de surface;
- montrer la variabilité de l'occurrence des kystes de *Giardia* totaux ainsi que leurs fractions viables par l'échantillonnage répétée de sources de pollution distinctes de types rurales (fèces de veau et de vache, fumier, exutoire) et urbaines (eaux usées) influençant les eaux de surface.

### 3.1.1.3 Objectifs spécifiques de modélisation

Les objectifs spécifiques des travaux concernant les données d'indicateurs ainsi que des modèles de flux de charge d'oocystes sont de :

- estimer les charges quotidiennes totales et unitaires d'oocystes totaux et infectieux de *Cryptosporidium* produites par des sources de contamination fécale rurale et urbaine selon des estimés de base et extrêmes;
- comparer l'enlèvement des oocystes de *Cryptosporidium*, des kystes de *Giardia* ainsi que des indicateurs microbiens et la turbidité de deux stations traitants les eaux usées en utilisant des étangs aérées et un bioréacteur séquentiel par leurs quantifications répétées respectives;
- évaluer les relations possibles entre les indicateurs microbiens et la turbidité et les oocystes de *Cryptosporidium* provenant de plusieurs sources de contamination fécale (effluent de STEP; ruisseau de drainage agricole) par des analyses statistiques comparatives.

## 3.2 Hypothèses de recherche

### 3.2.1 Hypothèse générale

La caractérisation des oocystes infectieux de *Cryptosporidium* retrouvés dans des sources de contamination urbaines et agricoles influence les estimations du risque sanitaire aux prises d'eau en eaux de surface.

#### 3.2.1.1 Hypothèses spécifiques au développement méthodologique

- L'optimisation du prétraitement de stimulation ainsi que du milieu d'infection de la méthode de détection par CC-IFA des oocystes infectieux apporte d'avantage de précision sur la quantification infectieuse des oocystes;
- La combinaison de la détection totale et infectieuse des oocystes sur le même échantillon diminue les biais engendrés par la division en deux analyses d'un échantillon hétérogène contenant des événements rares;
- Les tests de performances de récupération et du calcul d'infectivité de la nouvelle méthode supportent l'utilisation préférentielle des conditions expérimentales améliorées ainsi que de la double détection.

#### 3.2.1.2 Hypothèses spécifiques de la campagne d'échantillonnage

- L'amélioration des étapes de concentration et d'isolation des oocystes de *Cryptosporidium* et des kystes de *Giardia* apporte plus de précision sur leur quantification par les méthodes de détection;
- La validation de la méthode 3D-CC-IFA dans de multiples matrices complexes apporte confiance à son utilité étendue;
- La démonstration de la variabilité de l'occurrence des oocystes totaux ainsi que leurs fractions infectieuses par l'échantillonnage répétée de sources de pollution distinctes de types rurales et urbaines apporte plus de compréhension sur le risque que représente les oocystes dans les eaux de surface;

- L'exposition de la variabilité de l'occurrence des kystes de *Giardia* totaux ainsi que leurs fractions viables par l'échantillonnage répétée de sources de pollution distinctes de types rurales et urbaines soutient une plus grande compréhension de leur risque dans les eaux de surface.

### **3.2.1.3 Hypothèses spécifiques des données d'indicateurs récoltées ainsi que des modèles de charge d'oocystes produits.**

- L'estimation des charges d'oocystes totales et infectieuses de *Cryptosporidium* produites par des sources de contamination fécale rurales et urbaine vient renseigner la compréhension de leur risque dans les eaux de surface;
- La comparaison de l'enlèvement des oocystes de *Cryptosporidium*, des kystes de *Giardia* ainsi que des indicateurs microbiens et la turbidité de deux stations traitants les eaux usées rapporte de faibles abattements des parasites et peu de liens avec les indicateurs;
- L'évaluation des relations environnementales entre les indicateurs microbiens et la turbidité et les oocystes de *Cryptosporidium* provenant de plusieurs sources de contamination fécale supporte de faibles corrélations.

## **3.3 Méthodologie**

### **3.3.1 Développement méthodologique**

La première étape a consisté de faire la sélection de la méthode utilisée afin d'approfondir la connaissance du risque posé par les oocystes de *Cryptosporidium*. La revue de la littérature des méthodes disponibles nous a permis d'identifier les méthodes *in vitro* d'infectivité en culture cellulaire pour leur capacité à reproduire les résultats d'infectiosité obtenus chez les organismes vivants (Bukhari *et al.*, 2000; Rochelle *et al.*, 2002; Slifko *et al.*, 2002). Afin de confirmer notre choix et d'en apprendre d'avantage, nous avons contacté un expert en détection de pathogènes dans des échantillons environnementaux, Dr. Georges Di Giovanni de l'Université A&M du Texas. Il nous a chaleureusement accueilli dans son laboratoire et gentiment enseigné la méthode

de CC-IFA en automne 2006. Nous avons pu, par la suite, monter le laboratoire de Niveau II de la Chaire et implanter la méthode en 2007.

Les grandes étapes initiales de la méthode appliquées aux eaux de surface ont été les suivantes:

- concentration d'eau naturelle par filtration (Envirochek de Pall);
- purification par bille immunomagnétique (IMS de Dynal);
- prétraitement de stimulation des oocystes récupérés;
- inoculation des oocystes sur des cellules intestinales humaine en culture;
- période d'infection;
- immunodétection et dénombrement des foyers infectieux.

La revue de littérature des méthodes d'infectivité a révélé aussi plusieurs variations dans les prétraitements et dans les milieux d'infection. Un premier volet de l'optimisation de la méthode CC-IFA visait à maximiser le nombre d'oocystes infectieux environnementaux pouvant être mesurés tout en gardant une logique physiologique. Différentes variations des conditions physiologiques dans lesquels se multiplient *Cryptosporidium* ont été expérimentées. Visant les milieux de stimulation et d'infection, les essais ont porté sur l'influence de mélanges de différentes protéases et autres composés gastro-intestinaux sur la capacité des oocystes à générer des foyers. Les résultats ont montré que la meilleure combinaison de conditions consistait en un milieu de stimulation simplifié, n'utilisant que le tampon acidifié à pH 2 et un milieu d'infection supplémenté avec 50 mM de glucose. Les résultats obtenus figurent en détail dans le Chapitre 4.

Le second volet touche la combinaison de la détection totale et infectieuse, sur le même échantillon. Le biais de l'échantillonnage est ainsi amélioré et par conséquent, l'interprétation des résultats environnementaux facilitée. Pour y parvenir, des anticorps marqués avec des fluorochromes qui ont la capacité de détecter les oocystes et les foyers d'infection ont été utilisés. Le problème à surmonter a été la perte d'oocystes lors des lavages du tapis cellulaire. Environ 30% sont trouvés directement sur le tapis. Une série d'essais ont tenté d'améliorer ce nombre mais sans succès (ajout de gélatine et de bile au milieu d'infection, traitement aux protéases, centrifugation de l'inoculum sur le tapis cellulaire, augmentation du temps d'infection,

diminution du volume initial de milieu d'infection). Le développement d'une technique de filtration simple des eaux de lavages du tapis a permis de comptabiliser ces pertes et les intégrer aux comptes totaux.

La validation de la méthode s'est finalement faite par des essais de taux de récupération en utilisant des oocystes commerciaux précomptés. De plus, des mesures d'oocystes dosés et indigènes ont été effectuées dans différentes matrices telles que les eaux brutes, les boues de décanteurs et les eaux traitées de station de production d'eau potable pour valider la méthode implantée. Aucun problème de contamination des cellules en culture n'a été observé à ce niveau. Cependant, quelques essais sur des échantillons de boue de station de traitement d'eaux usées ont contaminé et tué les cellules. Aux antibiotiques et antifongiques déjà présents, l'ajout de Nystatine a réglé ce problème.

### **3.3.2 Campagne d'échantillonnage**

Initialement, la campagne d'échantillonnage devait avoir lieu dans les eaux brutes d'usines de traitement d'eau potable. Cependant, comme les concentrations historiques des oocystes totaux étaient faibles et leur prévalence basse, la recherche du sous-ensemble infectieux devenait source de beaucoup de conclusions difficiles. C'est ainsi que la décision s'est prise d'aller échantillonner directement dans les sources de contamination fécale affectant les eaux de surface et contenant potentiellement des oocystes infectieux pour l'humain. La recherche des fractions d'oocystes infectieux a été le point de mire central, car il permet de déduire la pire fraction infectieuse que l'on peut rencontrer dans les eaux brutes de station de production d'eau potable. Les volets ruraux et urbains ont pris forme de part les natures anthropogéniques et zoonotiques des espèces d'oocystes pathogènes pour l'humain.

Aux niveaux des sources de pollution fécale urbaine, les eaux usées se sont imposées. Surtout qu'au Québec, plusieurs stations d'épuration comportent seulement des traitements secondaires, profitant de l'important effet de dilution des milieux récepteurs. Trois types de rejets d'eaux usées municipales ont été être identifiés soit les effluents, les affluents déviés et les rejets de CSO. En visant l'échantillonnage des affluents et des effluents, des visions du pire cas et du cas quotidien des fractions infectieuses se sont dessinées. Les STEP ont été sélectionnées parce que



leurs eaux usées étaient majoritairement municipales et qu'elles ne désinfectaient pas leurs rejets. Au cours de l'hiver 2009, deux STEP ont été échantillonnées environ aux deux semaines, une ayant des étangs aérés et la seconde un abattement physico-chimique. Rapidement, des problèmes de taux de récupération se sont présentés sur les effluents de l'usine physico-chimique car les coagulants interféraient avec l'étape d'IMS. Une seconde usine de type bioréacteur séquentiel, ayant un traitement aussi biologique mais plus court que les étangs aérés, a été sélectionnée. L'échantillonnage s'est étendu d'avril à novembre 2009 pour un total de 19 affluents et 18 effluents répartis entre les deux stations.

Concernant les sources de pollution fécale rurale, il est établi que les veaux sont les principaux hôtes du zoonotique *C. parvum* (Fayer *et al.*, 1998; Olson *et al.*, 2004; Santin *et al.*, 2004). Aussi, des fermes laitières du Québec ont été répertoriées comme ayant une forte prévalence de 88.7% d'oocystes (Ruest *et al.*, 1998). Nous avons donc contacté des experts en agroenvironnement et établi une collaboration. Cette participation nous a permis de mener notre campagne d'échantillonnage dans le petit bassin-versant du ruisseau au Castor, tributaire de la rivière aux Brochets en Montérégie. Le territoire drainé par ce bassin-versant est presque exclusivement composé de fermes laitières. Ce bassin versant est aussi le site de plusieurs projets de recherche, notamment sur les parasites *Cryptosporidium* et *Giardia* ainsi que sur le transport du phosphore. L'accès aux fermes, à l'exutoire ainsi qu'à des données physico-chimiques historiques a été aussi très utile. Nous avons donc prélevé un total de 41 échantillons de fèces fraîches de veaux et de vaches répartis dans 6 fermes laitières, de 10 échantillons de fumier et de 10 prélèvements à l'exutoire du bassin-versant de juin à novembre 2009.

En plus des mesures de *Cryptosporidium* faites par la méthode 3D-CC-IFA, les comptes totaux et viables de *Giardia* ont systématiquement été mesurés avec la méthode standardisée US EPA 1623 (USEPA, 2005b). Aussi, les mesures standards des indicateurs microbiens *E. coli*, coliformes totaux et des streptocoques fécaux et des indicateurs physico-chimiques (turbidité et matière en suspension) ont été réalisées dans tous les échantillons sauf ceux de fèces et de fumier.

### 3.3.3 Outils prédictifs : indicateurs et modèle de charge

Dans le but d'apporter une application plus large aux comptes totaux et aux fractions infectieuses des oocystes ruraux et urbains, l'idée de modéliser la charge journalière émise par un animal ou un humain a germé.

Pour y arriver, la démonstration a d'abord été faite que les indicateurs classiques n'arrivent que rarement à prédire la concentration, la présence, l'abattement, la survie et le transport des oocystes de *Cryptosporidium*. Une revue de littérature initialement faite sur la présence connue des oocystes de *Cryptosporidium* a démontré que plusieurs sources sont possibles et qu'elles ne contribuent pas de manière égale en oocystes totaux et infectieux pour l'humain. Par la suite, une seconde revue de littérature a mise en évidence les efforts de divers groupes à corrélérer *Cryptosporidium* aux indicateurs dans différents milieux et a permis de poser une critique sévère à leur égard.

À partir des données de la présente étude, nous avons fragmenté ses indicateurs plus près de leur source afin de leur donner plus de sens. Premièrement, l'abattement des oocystes totaux ne se comparent pas aux abattements d'indicateurs dans les stations de traitement d'eaux usées. Aussi, des ratios comparant la présence de *E. coli* aux autres indicateurs et aux parasites en milieux ruraux et urbains n'apportent pas plus de cohérence aux indicateurs. L'utilisation de concentrations par rapport à l'utilisation de charges de *Cryptosporidium* dans le cas des liens avec les précipitations en milieu agricole arrive à démontrer que la pensée de charge est plus prédictive que celle en concentration.

Des modèles d'oocystes totaux et infectieux décrivant les charges moyennes et extrêmes émis quotidiennement par les animaux de fermes laitières et par les humains ont été développés. Utilisant les résultats issus de la présente étude et en les complétant avec celles retrouvées dans la littérature, des fonctions de distribution de probabilités (PDF) sont attribuées à chacune des variables. Une simulation de type Monte Carlo permet ensuite de calculer la distribution charges.

## **CHAPITRE 4. PUBLICATION #1: IMPROVED RISK ANALYSIS BY DUAL DIRECT DETECTION OF TOTAL AND INFECTIOUS CRYPTOSPORIDIUM OOCYSTS ON CELL CULTURE IN COMBINATION WITH IMMUNOFLUORESCENCE ASSAY**

Ce chapitre présente les récents avancements des méthodes de mesure de l'infectivité des oocystes de *Cryptosporidium*. Dans un premier temps, l'optimisation des procédures expérimentales a été réalisée en compilant et comparant les différents protocoles présents dans la littérature. Par la suite, la mesure directe de la fraction infectieuse sur un échantillon unique a été réalisée en intégrant le compte d'oocyste total au compte de foyer infectieux. Ce nouveau protocole sera appliqué dans le quatrième chapitre de cette thèse aux différentes sources de pollution fécale influençant la qualité des eaux ainsi qu'à des eaux de surface. Ces résultats ont été publiés dans *Applied and Environmental Microbiology* en janvier 2010.

### **DUAL DIRECT DETECTION OF TOTAL AND INFECTIOUS *CRYPTOSPORIDIUM* OOCYSTS ON CELL CULTURE WITH IMMUNOFLUORESCENT ASSAY (3D-CC-IFA): A METHOD TO IMPROVE RISK ANALYSIS**

**Cindy Lalancette \*, George D. Di Giovanni † and Michèle Prévost**

École Polytechnique de Montréal, Chaire Industrielle CRSNG en Eau Potable, Département des Génies Civil, Géologique et des Mines, CP 6079, Succ. Centre-ville, Montréal (Québec), Canada, H3C 3A7; †Texas A&M University System, Texas AgriLife Research Center at El Paso, Department of Plant Pathology and Microbiology, 1380 A&M Circle, El Paso, TX 79927-5020; \*Corresponding author: Phone: (514) 340-4711x3711. Fax: (514) 340-5918. E-mail: [cindy.lalancette@polymtl.ca](mailto:cindy.lalancette@polymtl.ca).

## 4.1 Abstract

The inactivation of *Cryptosporidium* oocysts is a main driver for the selection of water treatment disinfection strategies, and microbial risk analysis offers a sound basis on which to optimize water treatment processes. USEPA Method 1622/23 provides an estimation of the total oocyst count; however, it cannot be used directly for risk assessment, as it does not determine the fraction of infectious oocysts. An improved assessment of the risk at designated sources or in treated water requires an evaluation of total oocysts and an estimate of their infectivity. We developed a dual direct detection (3D) method using differential immunofluorescent staining which allows the detection of both oocysts and cell culture infection foci for each sample. Using *C. parvum* oocysts, various pH levels, proteases, and gastro-enteric compound and substrate were assessed for their ability to enhance the number of infection foci. Results showed that the key trigger for oocyst stimulation was acidification. The addition of a low concentration of D-glucose (50 mM) to the infection media increased infectivity rates, while a higher dosage (300 mM) was inhibitory. The total number of oocysts in each sample was determined by counting oocysts remaining on the cell monolayer and oocysts recovered from cell monolayer washes during processing using a simple filtration technique. With the 3D-CC-IFA method it is now possible to determine the number of total and infectious oocysts for a given sample in a single analysis. Direct percentages of infectivity are then calculated which will allow for more accurate risk assessments.

## 4.2 Introduction

Over the past two decades, *Cryptosporidium* has been one of the most frequently identified etiologic agents associated with drinking waterborne illness outbreaks in the United States (Craun *et al.*, 2006), England and Wales (Smith, 2006), and associated with 23.7% of worldwide protozoan outbreaks (Karanis *et al.*, 2007). In response to the emergence of this pathogen, regulations on the removal of *Cryptosporidium* oocysts have been promulgated in the USA with increased stringency (USEPA, 1998; 2005). Requirements for its removal during treatment are based on the estimation of total oocysts in raw water, and the average annualized incremental treatment costs associated with those requirements have been estimated to range from \$92 million

to \$133 million (USEPA, 2005a). USEPA Method 1622/23 (USEPA, 2005b) for the detection of *Cryptosporidium* in water provides a total oocyst count, but is not ideal for risk characterization aimed at optimizing water treatment from the perspectives of both infrastructure investment and public health protection (USEPA, 2005d). Method 1622/23 does not determine whether the detected oocysts are capable of infecting humans, or if they are infectious. In the risk analysis conducted by the USEPA, the proportion of the oocysts measured under the Information Collection Rule Supplement Surveys (ICRSS) that were estimated to be infectious was described by a triangular distribution (min: 30; max: 50), a method which is considered to be a source of uncertainty in evaluating risk. The USEPA estimate was based on the physical structure of the oocysts observed using Method 1622 and research data from cell culture oocyst infectivity studies, and represents the most likely proportion of environmental oocysts that were infectious (USEPA, 2005b). When using Method 1622/23 data, this distribution has a mode of 40%, which is reinforced by the infectious fraction of 37% published by LeChevallier *et al.* (2003) and the USEPA (USEPA, 2005b). However, proportions of infectious environmental oocysts may vary widely from site to site. Between 4-20% of surface water samples tested positive for this pathogen (Di Giovanni *et al.*, 1999; LeChevallier *et al.*, 2003; Schets *et al.*, 2005), while approximately 40% of wastewater samples tested positive (Gennaccaro *et al.*, 2003). In a survey of filtered, finished drinking water using a cell culture assay, 1.4% of samples tested positive for infectious *Cryptosporidium*, and 27% (22 of 82) of the treatment plants surveyed had at least one positive sample (Aboytes *et al.*, 2004).

*Cryptosporidium* is an obligate parasite that travels from host to host in the form of an oocyst. Once ingested by a human via contaminated food or water or via direct contact, body temperature and stomach acidity (pH 1.5-3.5) trigger oocyst excystation (Kato *et al.*, 2001). The oocysts are then carried to the small intestine where the chyme is alkalized at pH 8. Bile salts secreted at this point could also promote excystation (Kato *et al.*, 2001). Trypsin, the precursor of which is secreted by the pancreas, then enters the small intestine. Trypsin applied in an acidified buffer is considered to be a suitable in vitro excystation treatment (Hijjawi *et al.*, 2004) and a stimulant of sporozoite motility (Smith *et al.*, 2005). In the small intestine, excysted sporozoites colonize enterocytes forming parasitophorous vacuoles. Bile salts, especially sodium taurocholate, appear

to enhance sporozoite invasion by boosting their proteinic secretions and their gliding motility (Feng *et al.*, 2006).

The methods available to estimate oocyst infectivity vary considerably in their oocyst stimulation and infection conditions, as well as in their application (e.g., water, wastewater, method development, biological study, disinfection assay, drug assay, etc.) (Table 4.1). Ice-cold bleach and acidified Hank's balanced salts buffer (AHBSS) supplemented with trypsin at body temperature are used as simulation media. Bile or its salts have also been used as the stimulating agent in one study and compared positively to bleach treatment (Gold *et al.*, 2001). The cell culture medium supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS) is widely used. Other supplements (vitamins, bile salts, sugars, and antibiotics) can also be added. Another important variation among the methods is the infection criteria, which are dependent on the objective of the method. For example, if the objective is to quantify the impact of stimulation and the infection media conditions on the motility or pattern of observable infection under simulated conditions, then a method analyzing life stages or foci density is used. In contrast, if the goal is to estimate infectious foci, then direct foci counts or the most probable number (MPN) method would be more suitable. However, MPN has limited application with a low concentration of organisms, which is often the case with *Cryptosporidium* oocysts in environmental samples (Carey *et al.*, 2006).

Regulatory occurrence datasets collected using Method 1622/23 for drinking water supplies report total oocyst counts (USEPA, 1996; 2005a; 2005b), but these total counts do not provide a basis on which to estimate the proportion of infectious oocysts found in the environment (Di Giovanni *et al.*, 1999). Quantification of this fraction is needed to reduce uncertainties and improve risk analysis (USEPA, 2005a). Current analytical approaches present a substantial shortcoming as they require a given sample to be divided for multiple analysis. For example, a fraction of the sample is analyzed by an immunofluorescent detection assay for total oocysts (e.g. Method 1622/23) and a distinct fraction is analysed by cell culture for infectivity (e.g. CC-IFA). Consequently, the physical division of samples provide at best indirect estimations of the proportion of infectious oocysts. For example, in one study examining surface water that used the split sample approach, 593 samples were analyzed using Method 1622/23 and 560 samples were analyzed using a cell culture infectivity assay (some sample splits were lost, resulting in uneven

numbers of samples assayed) (LeChevallier *et al.*, 2003). The authors reported that 60 of the Method 1622/23 samples and 22 of the cell culture infectivity assay samples tested positive, resulting in an estimated 37% of the detected oocysts being infectious. However, a Monte Carlo simulation of oocyst distribution and positive result probabilities was needed to support this estimate, since only one set of split samples tested positive by both assays.

The general objective of this study was to develop and optimize a method for the combined detection of total and infectious oocysts that could be used to improve *Cryptosporidium* risk assessments. Several different oocyst stimulation treatments and cell culture medium supplements were evaluated to optimize the *Cryptosporidium* cell culture infectivity assay. Several different commercial antibodies with different fluorochromes were evaluated individually and in combination for the immunofluorescent detection of oocysts and cell culture infection foci.

Table 4.1: Stimulation conditions, infection media, and infection criteria of various *Cryptosporidium* viability and infectivity studies.

Reference	Objective	Simulated media		Infection criteria	Comments
		Stimulation	Infection		
(Campbell <i>et al.</i> , 1992)	Method development	AHBSS pH 2.75; 1 hr at 37°C	4 hr at 37°C in either: Hanks MEM, 0.57% bovine bile; 0.06% NaHCO <sub>3</sub> or: HBSS, 0.08% Na deoxycholate; 0.18% NaHCO <sub>3</sub>	Excystation  DAPI+	Diluted acid mimics in vivo more, with no significant oocyst death; 0.1M NaOH, 0.1M HCl increased oocyst death; Above 37°C, sporozoites do not survive; Below 37°C, little effect on excystation
(Upton <i>et al.</i> , 1995)	Method development	10% Bleach, 10 min at 4°C	RPMI 1640, 10% FBS, 15 mM HEPES, 50 mM glucose, 3.5% ascorbic acid, 0.1% folic acid, 0.4% 4-aminobenzoic acid, 0.2% calcium pantothenate, 0.1 U/ml insulin, 100 U/ml penicillin G, 10% streptomycin, 0.025% amphotericin B (pH 7.4)	Life stage count	25 medium supplements examined; Infectivity enhancers: 10% FBS, sugars (glucose, galactose, maltose, mannose), insulin, vitamins (ascorbic acid, calcium pantothenate, folic acid, para-aminobenzoic acid)
(Slifko <i>et al.</i> , 1997)	Method development	10.5% Bleach, 10 min at 4°C	RPMI 1640, 10% FBS, 2 mM L-glutamine, 20 mM HEPES	Focus detection method	Detects more foci than seeded oocysts
(Di Giovanni <i>et al.</i> , 1999)	Occurrence in natural water and filter backwash	AHBSS, 1% trypsin, 1 hr at 37°C	RPMI 1640 with L-glutamine, 10% FBS, 15 mM HEPES, 50 mM glucose, 35 mg/L ascorbic acid, 1.0 mg/L folic acid, 4.0 mg/L 4-aminobenzoic acid, 2.0 mg/L Ca pantothenate, 100,000 U/L penicillin G, 100 mg/L streptomycin, 700 mg/L amphotericin B, 12.5 mg/L tetracycline	PCR positive	Not quantitative



Table 4.1: Stimulation conditions, infection media, and infection criteria of various *Cryptosporidium* viability and infectivity studies (suite).

Reference	Objective	Simulated media		Infection criteria	Comments
		Stimulation	Infection		
(Rochelle <i>et al.</i> , 1999)	IMS comparison	HBSS, 0.7% bile, 5 mM NaHCO <sub>3</sub> , 3 hr at 37°C	EMEM or RPMI 1640; 0.1% bovine serum albumin	Sporozoites infection by PCR detection	Oocysts excysted while in complex; Sporozoites purification prior to infection
(Slifko <i>et al.</i> , 1999)	Method development Disinfection study	10.5% Bleach, 5-8 min at 4°C	RPMI 1640, 10% FBS, 2 mM L-glutamine, 20 mM HEPES	MPN	Comparable with animal infectivity
(Freire-Santos <i>et al.</i> , 2000)	Survival assay	0.5% pepsin, 0.7% HCl, 0.9% NaCl; 30 min at 37°C; 2.2% NaHCO <sub>3</sub> , 0.22% Na taurocholate, 0.04% bovine trypsin; 120 min at 37°C	Not applicable	Empty oocysts	Excystation protocol; Authors obtained 95% excystation
(Lindsay <i>et al.</i> , 2000)	Drug assay	Bleach	Not described	Fluorescence intensity read out by ELISA plate counter	Comparable results with animal assay

Table 4.1: Stimulation conditions, infection media, and infection criteria of various *Cryptosporidium* viability and infectivity studies (suite).

Reference	Objective	Simulated media		Infection criteria	Comments
		Stimulation	Infection		
(Gold <i>et al.</i> , 2001)	Method development	None	RPMI 1640, 10% FBS, 15 mM HEPES, 50 mM glucose, 3.5% ascorbic acid, 0.1% folic acid, 0.4% 4-aminobenzoic acid, 0.2% Ca pantothenate, 0.1 U/ml insulin, 100 U/ml penicillin G, 10% streptomycin, 0.025% amphotericin B (pH 7.4), 0.375% Na taurocholate	Parasite count at 1000X	Na T better than bleach; No stimulation required with Na T
(Weir <i>et al.</i> , 2001)	Method development	10% Bleach, 8 min at 4°C	RPMI 1640, 10% FBS, Opti-MEM, Pen-Stept-Amph	MPN and foci count	Centrifuge stimulated oocysts on cell monolayers shorten infection time
(Rochelle <i>et al.</i> , 2002)	Disinfection assay Comparative study	RPMI, 0.75% Na taurocholate 10 min at 37°C	RPMI 1640, 4 mM L-glutamine, 2% FBS, 30 mM HEPES, 100 U/ml of penicillin, 100 g/ml streptomycin, 100 g/ml kanamycin, 0.25 g/ml amphotericin B	MPN and foci count	Na T incubation increases oocyst infectivity; Comparable to animal infectivity
(Gennaccaro <i>et al.</i> , 2003)	Occurrence in a waste water treatment plant	10% Bleach, 8 min at room temp.	Growth medium	MPN	

Table 4.1: Stimulation conditions, infection media, and infection criteria of various *Cryptosporidium* viability and infectivity studies (suite).

Reference	Objective	Simulated media		Infection criteria	Comments
		Stimulation	Infection		
(LeChevallier <i>et al.</i> , 2003)	Occurrence in river water	AHBSS, 1% trypsin, 1 hr at 37°C	RPMI 1640 with L-glutamine, 10% FBS, 15 mM HEPES, 50 mM glucose, 35 mg/L ascorbic acid, 1.0 mg/L folic acid, 4.0 mg/L 4-aminobenzoic acid, 2.0 mg/L Ca pantothenate, 100,000 U/L penicillin G, 100 mg/L streptomycin, 700 mg/L amphotericin B, 12.5 mg/L tetracycline	PCR positive	Reported CC-PCR infectivity- positive samples compared to and Method 1623 positives with paired samples.
(Mele <i>et al.</i> , 2003)	Method development	2mM Na Taurocholate; 10 min at 15°C 5-8 min at 37°C	Not specified	Detection of infected cells by flow cytometry	Correlated with IFA visual count Less operator bias Faster
(Quintero-Betancourt <i>et al.</i> , 2003)	Occurrence in reclaimed water Comparison of method	10% Bleach, 8 min at room temp.	RPMI 1640, 10% FBS, 20 mM HEPES, 2 mM L-glutamine, 10% Optimem	FDM-MPN	Reproducible and sensitive

Table 4.1: Stimulation conditions, infection media, and infection criteria of various *Cryptosporidium* viability and infectivity studies (suite).

Reference	Objective	Simulated media		Infection criteria	Comments
		Stimulation	Infection		
(Aboytes <i>et al.</i> , 2004)	Occurrence in filtered drinking water	AHBSS, 1% trypsin, 1 hr at 37°C	RPMI 1640 with L-glutamine, 10% FBS, 15 mM HEPES, 50 mM glucose, 35 mg/L ascorbic acid, 1.0 mg/L folic acid, 4.0 mg/L 4-aminobenzoic acid, 2.0 mg/L Ca pantothenate, 100,000 U/L penicillin G, 100 mg/L streptomycin, 700 mg/L amphotericin B, 12.5 mg/L tetracycline	PCR positive	Used gp60 region to differentiate environmental isolates from lab controls
(Hijjawi <i>et al.</i> , 2004)	Biological study	0.5% Trypsin at pH2.5-3, 20 min at 37°C; RPMI 1640, 0.03% L-glutamine, 0.3% Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> , 0.02% bovine bile, 0.1% glucose, 0.025% folic acid, 0.1% 4-aminobenzoic acid, 0.050% Ca pantothenate, 0.875% ascorbic acid, 1% FCS, 0.36% HEPES buffer, 1000 U/L penicillin G 0.01% streptomycin at pH 7.4	Not applicable	Complete life cycle	Cell-free culture

Table 4.1: Stimulation conditions, infection media, and infection criteria of various *Cryptosporidium* viability and infectivity studies (suite).

Reference	Objective	Simulated media		Infection criteria	Comments
		Stimulation	Infection		
(Di Giovanni and LeChevallier, 2005)	Method development	AHBSS, 1% trypsin, 1 hr at 37°C	RPMI 1640 with L-glutamine, 10% FBS, 15 mM HEPES, 50 mM glucose, 35 mg/L ascorbic acid, 1.0 m/L folic acid, 4.0 mg/L 4-aminobenzoic acid, 2.0 mg/L Ca pantothenate, 100,000 U/L penicillin G, 100 mg/L streptomycin, 700 mg/L amphotericin B, 12.5 mg/L tetracycline	PCR-positive	Faster detection; Quantitative PCR detection; Not for disinfection assay (background signal at high oocyst inocula levels); Standard curve not universal
(Schets <i>et al.</i> , 2005)	Occurrence in surface water	AHBSS pH 2.7, 1hr at 37°C; 1% bovine bile, 0.44% NaHCO <sub>3</sub> , 30min at 37°C	DMEM, 25 mM HEPES, 45% glucose, 10% FBS, 0.1% MEM-NEAA, 0.1% L-glutamine, 0.005% gentamicin	Foci and ID50	Assay not sensitive enough for low environmental counts
(Bukhari <i>et al.</i> , 2007)	Method development	AHBSS	RPMI, 0.05% bile	Foci count	Blind trial demonstrates that CC-IFA is a good surrogate for animal infectivity
(Johnson <i>et al.</i> , 2007)	Method development	AHBSS pH 2, Trypsin 1%, 1 hr at 37°C	RPMI 1640 with L-glutamine, 10% FBS, 100,000 U/L penicillin G, 100 mg/L streptomycin, 700 mg/L amphotericin B	Foci count	Reference CC-IFA protocol
<b>Ref Meth</b>					

## 4.3 Materials and method

### 4.3.1 Source of *Cryptosporidium* oocysts

Viable *C. parvum* Iowa (Harley Moon) isolate oocysts passaged through mice were purchased from Waterborne Inc. (New Orleans, LA). All lots were used within two months post shedding and stored at 4°C.

### 4.3.2 Cell culture

Human ileocecal adenocarcinoma HCT-8 cells (ATCC CCL-244) were cultivated in RPMI 1640 medium containing GlutaMAX<sup>TM</sup> and 25 mM HEPES buffer (Invitrogen Canada Inc., Burlington, ON) supplemented with 5% heat-inactivated fetal bovine serum (FBS) (Invitrogen Canada Inc., Burlington, ON), 0.1 g kanamycin liter<sup>-1</sup>, 100,000 U of penicillin G liter<sup>-1</sup>, 100 mg streptomycin liter<sup>-1</sup>, 250 amphotericin liter<sup>-1</sup> (Calbiochem, San Diego, CA). Cells were grown in 75 cm<sup>2</sup> culture flasks (BD Falcon, VWR Canada) in a 5% CO<sub>2</sub> atmosphere at 37°C. Passages were performed every 3 to 4 days. For infectivity studies, cells were seeded on Lab Tek II multi-chamber slides (#154534, Nalge Nunc, Naperville, IL) at a target density of  $2.2 \times 10^4$  cells per chamber in 500 µl cell culture media and incubated in a 5% CO<sub>2</sub> atmosphere at 37°C. Within 48 h, monolayer confluence was reached. No cells beyond 25 passages were used.

### 4.3.3 Oocyst stimulation pretreatment

Oocysts were pretreated by incubation in an acidified Hanks' balanced salt solution (HBSS #H9269 Sigma-Aldrich, St-Louis, MO) at pH 2 for 1 h at 37°C with vigorous 10 sec vortex mixing every 15 min. In the optimization experiments, various supplements were freshly added to the AHBSS: trypsin type II-S from porcine pancreas (#T7409 Sigma-Aldrich, St-Louis, MO) and pepsin from porcine stomach mucosa (#P7012 Sigma-Aldrich, St-Louis, MO); and to non-acidified HBSS: bile bovine (#B3883 Sigma-Aldrich, St-Louis, MO). These combinations were selected based on the literature reviewed.

### 4.3.4 Infection of cell monolayers

Stimulated oocysts were washed twice using prewarmed infection media and microcentrifugation (17,000 x g at room temperature for 2 min without brake). Final inoculum volumes were adjusted

to 500  $\mu$ L. Inoculated cell monolayers were incubated for 72 h in a 5% CO<sub>2</sub> atmosphere at 37°C. For the control infection, cell culture infection medium containing 10% FBS was used. To evaluate the effects on infectivity, different supplements were added to the infection medium: D+Glucose (#G8270, Sigma-Aldrich) and bovine bile (#B3883, Sigma-Aldrich). These additions were selected based on the literature reviewed (Table 4.1).

#### **4.3.5 Detection of infection**

Infection medium was removed from each slide chamber and monolayers were fixed with 500  $\mu$ L absolute methanol (#65542, Sigma-Aldrich, Germany) for 10 min. The methanol was removed and the monolayers air dried. Monolayers were then blocked for a minimum of 30 min on a rocking platform at room temperature using 500  $\mu$ L PBS containing 0.002% Tween-20 (BP337-100, Fisher Scientific, Fair Lawn, NJ) and 2% goat serum (G9023, Sigma-Aldrich). The slides were subsequently washed with PBS twice and stained using various antibodies. Antibodies tested were CY3 labeled Crypt-a-Glo (# A400CY3R-1X, Waterborne); CY3 labeled Sporo-Glo (# A600CY3R-1X Waterborne), and FITC labeled EasyStain GC combo (# EST CG80, BTF, Sydney, Australia) in a volume of 150  $\mu$ L. The antibody-mix dilutions (1/10; 1/50; 1/100) and wash buffers evaluated included PBS and the BTF fixing buffer from the BTF EasyStain kit. Slide chambers were removed, 2 drops of CitiFluor glycerol/PBS AF1 (#CM 512-1, Canemca Marivac, QC, Canada) mounting medium added, coverslips added and slides sealed with nail polish. Monolayers were observed for the presence of infection foci and oocysts at 200X magnification (600X for environmental samples) using epifluorescence microscopy (BX51, Olympus, Tokyo, Japan) with FITC (U-N51006, Olympus, Tokyo, Japan) and CY3 (U-N4107A, Olympus, Tokyo, Japan) filters.

#### **4.3.6 Filtration count of oocysts**

To count oocysts in solutions or to estimate oocyst losses at various steps in the protocol, spent wash solutions were processed through the following protocol. First, spent washes were microcentrifuged at 17,000 x g for 2 min. Pellets were suspended in 100  $\mu$ L of a 1/50 dilution of BTF GC combo antibodies in BTF fixing buffer for 2 h at room temperature on a rocking platform at low speed. Stained oocysts were washed once with 500  $\mu$ L BTF fixing buffer and

centrifuged again. Pellets were suspended in 500  $\mu$ L BTF fixing buffer and filtered by vacuum through a 0.45  $\mu$ m polycarbonate filter (#HAWGO4756, Millipore, Billerica, MO). The tip and tube used were rinsed with 200  $\mu$ l of BTF fixing buffer and the rinse solution was passed through the filter to maximize oocyst recovery. The unused edges of the filter were removed using flame sterilized scissors and the filter placed on a microscopic slide. CitiFluor Glycerol/PBS AF1 (#CM 512-1, Canemca Marivac, QC, Canada) was used as a mounting medium. Reproducibility of staining characteristics for a 1/10 dilution of Crypt-a-Glo in PBS and 1/50 dilution of GC combo in BTF fixing buffer was evaluated using three replicates of the same oocyst stock suspension.

#### **4.3.7 Excystation rate of stimulated oocysts**

Oocyst suspensions underwent stimulation pretreatment and were then examined to determine excystation rates. Oocysts were observed under differential interference contrast (DIC) microscopy at 1000X magnification. The first 75 randomly encountered oocysts were determined to be intact or excysted.

#### **4.3.8 Effect of the proportion of UV-killed oocysts on cell culture infectivity and oocyst retention on monolayers**

Untreated and UV-inactivated (100 mJ/cm<sup>2</sup> at 253,7 nm by a collimated beam built according to the Bolton *et al.* (2003) specifications and using a low pressure UV lamp Trojan UVMax 40``) oocyst suspensions of approximately 500 oocysts were mixed in increasing proportions (0:1, 1:4, 1:1, 3:4, 1:0). Foci and oocysts on the cell monolayers were enumerated.

#### **4.3.9 3D-CC-IFA method recovery**

For method recovery trials and seeded environmental matrices, oocyst inocula (500 oocysts) were prepared using flow cytometry by the Wisconsin State Laboratory of Hygiene. Oocysts were added to the optimized pretreatment stimulation media (AHBSS without trypsin). Once stimulated, the oocysts underwent the infection period in the optimized infection medium (50 mM supplemented glucose). Detection was performed using Sporo-Glo stain for infection foci and the BTF GC combo for oocyst detection on cell monolayers and in spent monolayer washes.



#### **4.3.10 Spiked environmental assay for recovery study from IMS purification**

Grab samples from Yamaska and Mille-Iles rivers water (Quebec, Canada) were repeatedly centrifuged at 1500 g for 15 min until one pellet of 0.5 ml per IMS reaction was formed. A volume of 5 ml of supernatant was kept above the 0.5 ml pellet and a vigorous vortex was applied to homogenize it. This concentrate and oocysts were added to the IMS protocol Leighton tube and another vigorous vortex mixing was applied. IMS capture was performed twice in line with the Dynabeads anti-*Cryptosporidium* kit (#730-01, Invitrogen Canada, Burlington, ON) directives and USEPA 1622 protocol (USEPA, 2005b). The complexes were then dissociated in the pretreatment stimulation step of the 3D-CC-IFA method and beads removed after the 1 h incubation at 37°C. To avoid fungal contamination, 240 000 U nystatin liter<sup>-1</sup> (#N1638 Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) was added to the infection media.

#### **4.3.11 Direct and indirect calculations of the percentage of infectious oocysts from the CC-IFA**

Infectious foci coming from either environmental samples or spiked oocysts are reported on their corresponding total oocyst counts. These ratios can be done either indirectly or directly. The indirect enumeration method requires a split sample (e.g. IMS-purified oocysts divided into the total and the infectious methods) and each sub sample provides either a count of infectious oocysts (i.e. infectious foci) on a cell culture assay or total oocyst counts by the USEPA 1623 method. In the direct (3D-CC-IFA) enumeration method, the numbers of total and infectious oocysts are determined for a single sample into a single analysis.

### **4.4 Results**

#### **4.4.1 Reference counts**

Results with various media formulations were compared to the reference method (Table 4.1). The reference method uses AHBSS 1% trypsin as the stimulation pretreatment and RPMI with 10% FBS plus antibiotics as the infection medium. When comparing all results to the reference method, the mean percentages of oocyst infectivity (foci counts reported on the number of

oocysts inoculated) were  $7.4\% \pm 4.0\%$  ( $n = 25$ ). All results were then reported as a ratio of the N foci / N foci AHBSS 1% trypsin reference method. Also, Figure 4.1 presents an overview of the whole 3D-CC-IFA method.

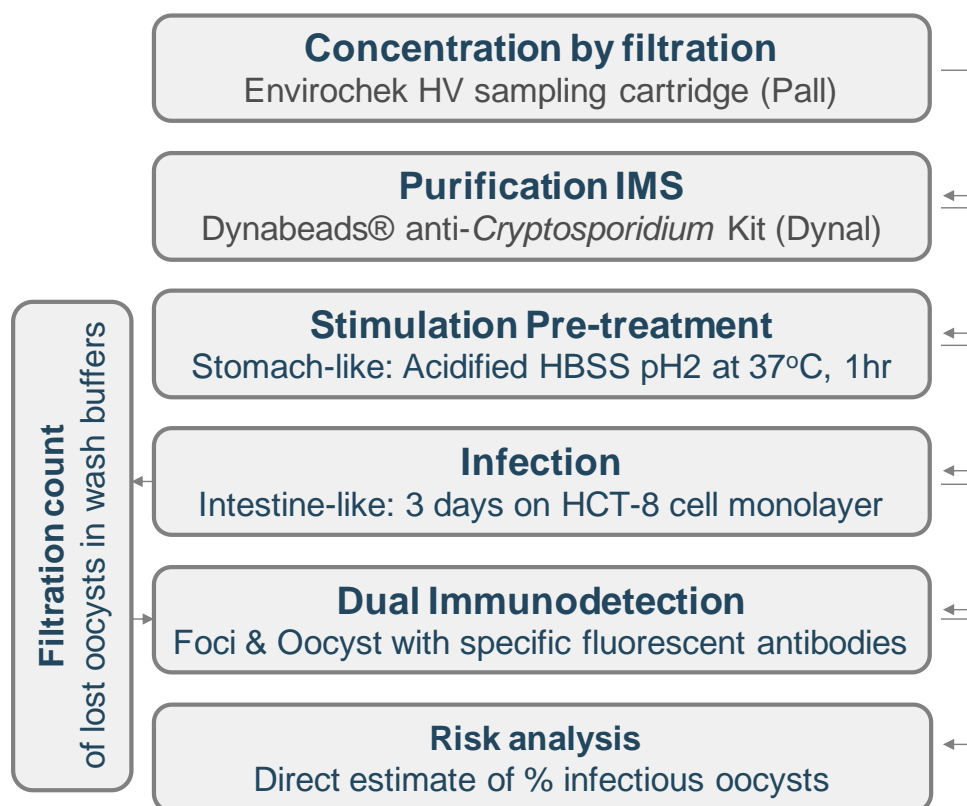


Figure 4.1: Summary of the sequence of steps of the final 3D-CC-IFA method.

#### 4.4.2 Stimulation pretreatment

Figure 4.2 shows that the treatment of oocysts with trypsin at concentrations equal to or less than 1% can slightly increase the number of cell culture infection foci. At higher concentrations, a significant decrease (0.25 to 1% vs. 2% trypsin:  $p < 0.05$ ) in the number of infection foci was observed. The addition of pepsin did not improve infection (1% trypsin vs. 0.25% pepsin:  $p > 0.1$ ), and at higher concentrations ( $> 0.5\%$ ) significantly decreased the number of foci detected (0.06 to 0.5% vs. 1-2% pepsin:  $p < 0.01$ ). Based on these results, AHBSS was selected as the stimulation pretreatment. Levels of oocyst excystation during the 1 h stimulation treatment

(which is undesirable) were determined and found to be only 1.3% for AHBSS containing 1% trypsin and less than 1.3% for AHBSS alone.

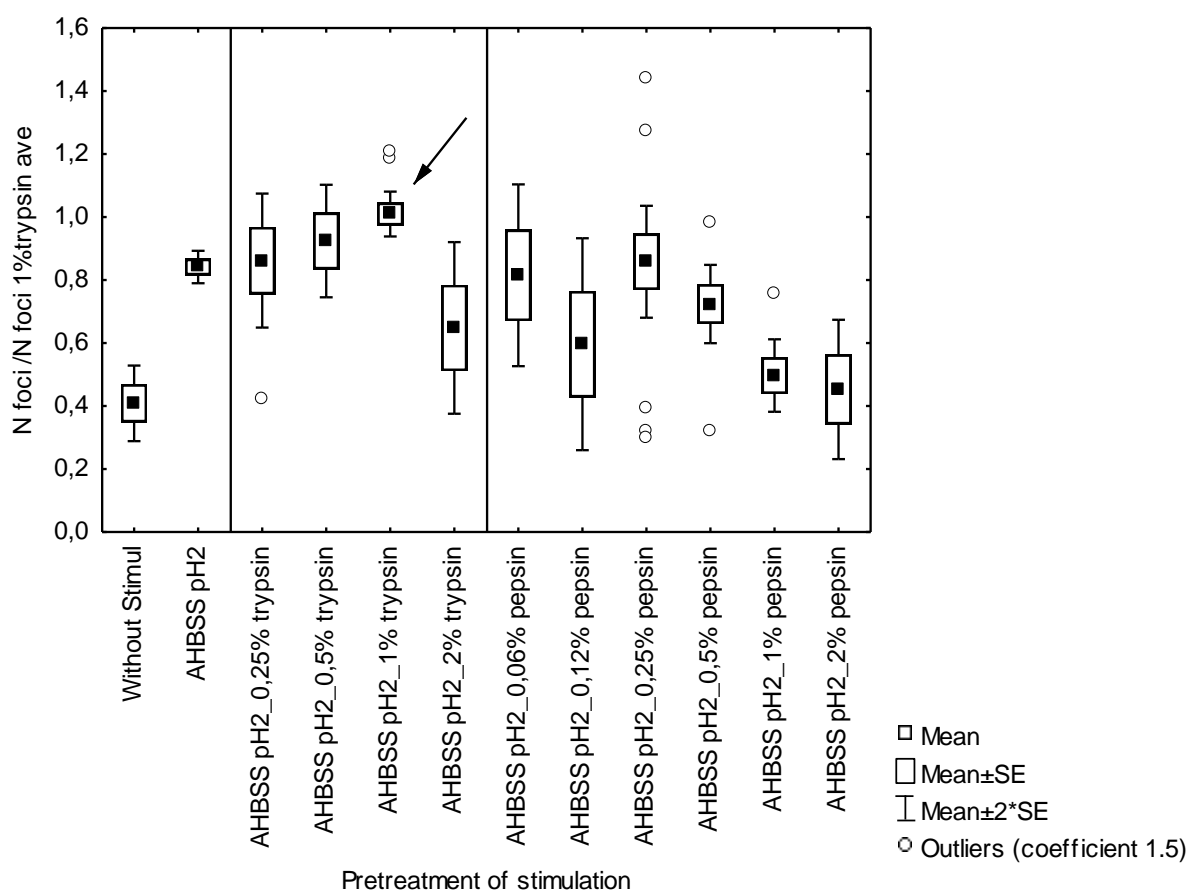


Figure 4.2: Impact of trypsin and pepsin addition in the stimulation pretreatment (AHBSS for 1 hr at 37°C) of *C. parvum* cell culture infection foci (combined data from 1-5 experiments; n=3-15).

### 4.4.3 Addition of bile to stimulation and infection media

Figure 4.3 illustrates the impact of adding bile to stimulation and infection media at neutral pH in order to mimic pH conditions found in the duodenum. Bile clearly inhibits foci development when added to either step.

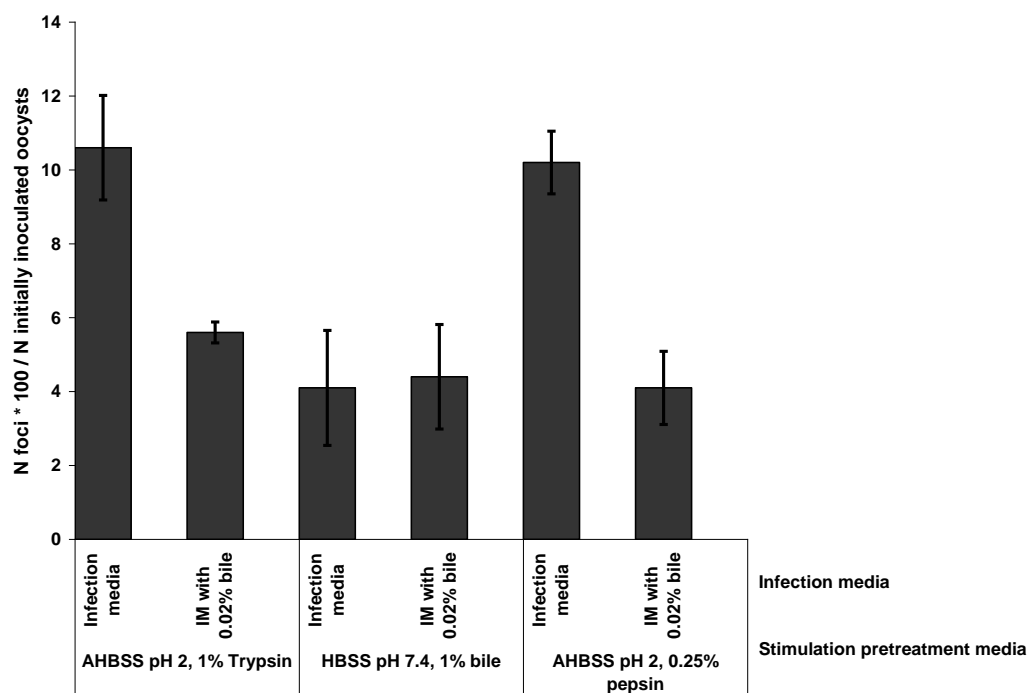


Figure 4.3: Impact of bile addition in pretreatment stimulation (pH 7.4) and infection media (IM) on *C. parvum* cell culture infection foci and calculation of percentage of infectious oocysts in the inocula (n = 2; bars are minimum and maximum)

#### 4.4.4 Optimization of infection media

Figure 4.4 shows that the addition of glucose to the infection media at concentrations over the reference value of 10 mM influenced the count of infectious foci. At a concentration of 50 mM, a significant increase (AHBSS pretreatment and 10 mM glucose vs. 50 mM glucose in infection media:  $p < 0.1$ ) in foci count was noted, but, at a higher concentration (300 mM), glucose inhibited infectivity. Other concentrations did not produce significant changes.

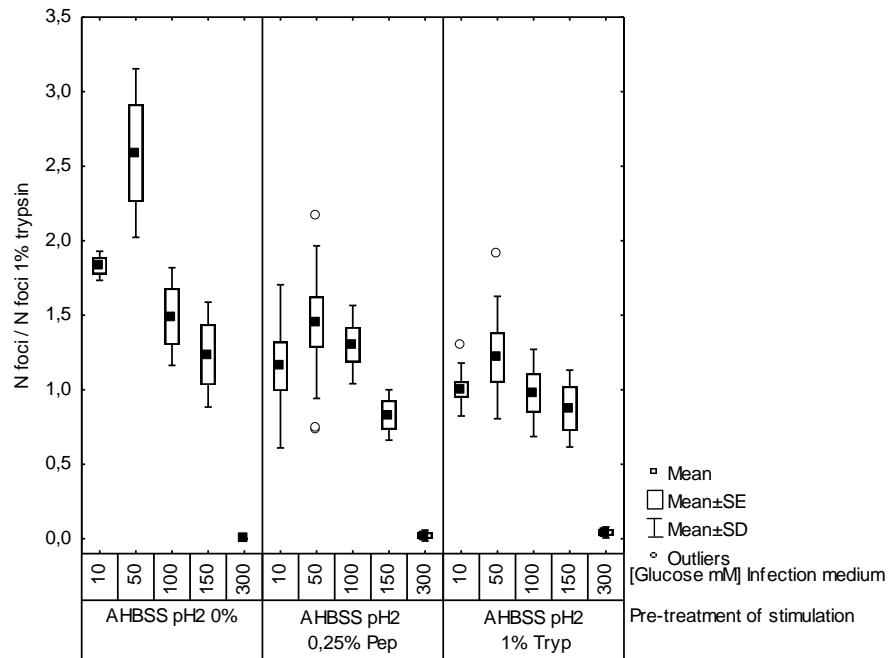


Figure 4.4: Effect of glucose concentration on the development of infection foci (combined data from 1-5 experiments;  $n = 3-11$ )

#### 4.4.5 Dual detection : sources of oocyst loss during sample processing

To estimate oocyst losses at various steps of the CC-IFA procedure, spent wash solutions were processed by membrane filtration to recover any oocysts present. Figure 4.5 presents the various levels of oocyst recoveries from spent washes at different steps in sample processing. As anticipated, the stimulation step washes accounted for only a small portion ( $3.7\% \pm 2.4\%$ ) of the total oocyst loss compared to the post infection steps ( $28.0\% \pm 4.7\%$ ), and the loss on the cell monolayer ( $39.6\% \pm 7.0\%$ ).  $32.5\% \pm 10\%$  remained unaccounted for. The sources of these losses are not clear but may well be the result of the manipulations. Importantly, these results present low variations and can therefore be reproduced.

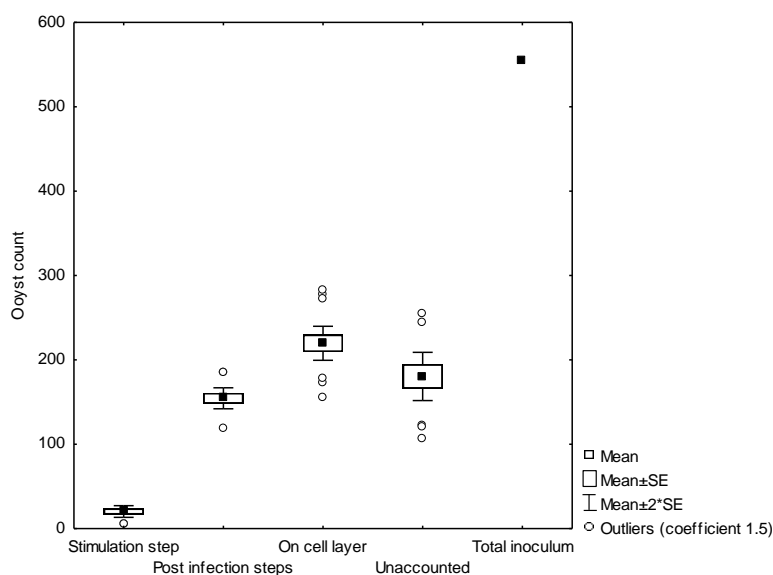


Figure 4.5: Recovery of oocysts during processing steps of the CC-IFA method ( $n = 15$ ). For the stimulation and post-infection processing steps oocysts were recovered from spent sample washes by filtration.

#### 4.4.6 Dual detection: what could influence oocyst adhesion to the cell monolayer?

To assess the impact of viability on adherence, CC-IFA was performed on mixtures with increasing proportions of UV inactivated oocysts. Figure 4.6 shows that inactivated oocysts were retained on the cell monolayer to the same extent as untreated oocysts. The decrease in the percentage of infectious foci ranged from approximately 0 to 100% and was proportional to the increasing fraction of UV-inactivated oocysts mixtures.

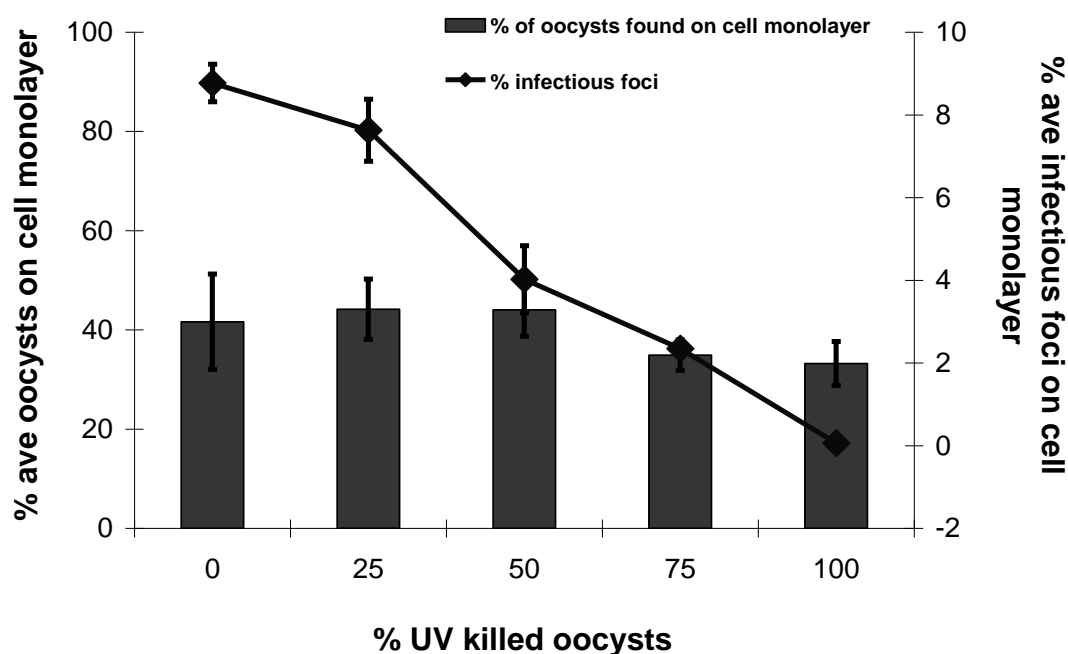


Figure 4.6: Adherence of UV-inactivated oocysts (100mJ/cm<sup>2</sup> by collimated beam) to cell monolayers (n = 3, Errors bars are standard deviations).

The impact of using low-volume inocula to promote contact of oocysts with cell monolayers was assessed. The use of up to a 7 h incubation with a low inoculum volume (100  $\mu$ L) before adding the remaining infection media (a total volume of 500  $\mu$ L) did not significantly influence (p-value  $\gg 0.1$ ) oocyst retention (data not shown) or the development of foci. The impact of the duration of the incubation time (i.e. 72, 96 and 120 h) on the retention of oocysts on cell monolayers was also investigated and was found to not greatly affect oocyst retention on monolayers (data not shown). On the basis of these results, we elected to incorporate the estimation of oocysts in post infection waste streams in the method, instead of continuing to attempt to optimize oocyst retention. General microscopic observations of the infected cell monolayers and waste solutions did not reveal any trends in the preferential retention of full or open oocysts, nor on the simultaneous presence of foci and open or intact oocysts.

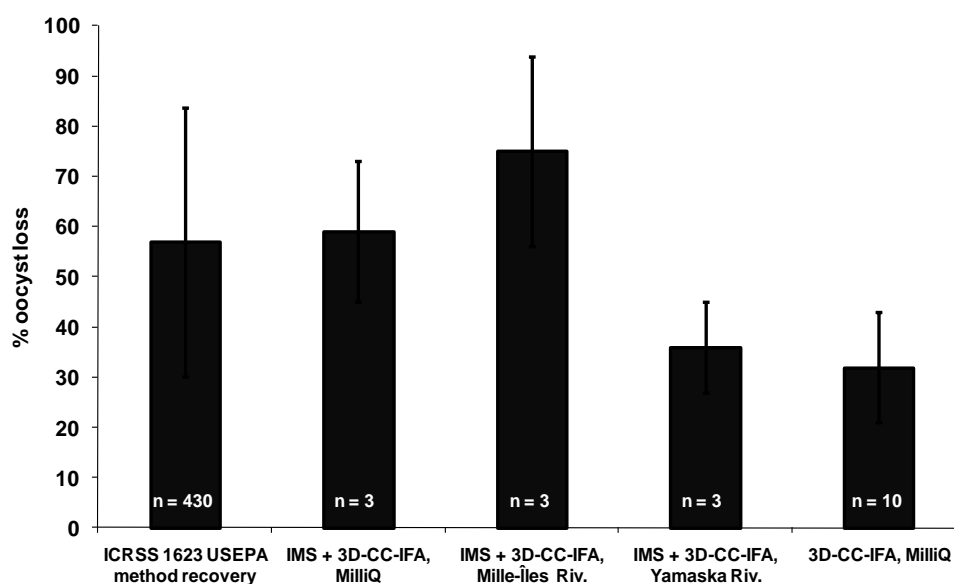


Figure 4.7: Comparison of reported by the USEPA and measured (this study) oocyst loss through steps of the US EPA 1622/3 method and of the 3D-CC-IFA in two different natural waters and MilliQ water using flow cytometry sorted *C. parvum* oocysts. IFA: Immunofluorescent assay microscopy. ICRSS: Information Collection Rule Supplemental Surveys, (Connell *et al.*, 2000). Errors bars are standard deviations.



#### 4.4.7 Selection of antibodies

For the filtration count technique, Crypt-a-Glo™ (WB) and GC Combo™ (BTF) were compared using a reference oocyst suspension that was counted in triplicate. Results showed no significant difference between Crypt-a-Glo (WB) ( $437 \pm 68$  oocysts) and BTF GC 1/100 ( $458 \pm 35$  oocysts) ( $p\text{-value} \gg 0.1$ ). For the detection of oocysts and infection foci on cell monolayers, various antibodies were investigated either alone or in combination. Results demonstrated that Crypt-a-Glo™ detected both foci and oocysts, while Sporo-Glo™ and GC Combo™ detected respectively foci and oocysts. The lowest background staining was observed using the following conditions: Crypt-a-Glo™ 1/10 in PBS for 1 h at room temperature; Sporo-Glo™ 1/10 in PBS for 1 h at room temperature; and GC Combo™ 1/10 in BTF fixing buffer for 1 h at room temperature. Although there was no significant difference in the counts (data not shown), combining Cy3-labeled Sporo-Glo™ with FITC-labeled GC Combo™ in BTF fixing buffer eased and clarified observations of both oocysts and infection foci (Figure 4.7).

#### 4.4.8 3D-CC-IFA recovery studies

Using flow cytometry sorted oocyst samples, recoveries for 3D-CC-IFA alone were  $68\% \pm 11\%$  ( $n = 10$ ). The calculated percentage of infectious oocysts in the inocula varied, depending on the reference count used:  $12\% \pm 1\%$  using indirect counts ( $N \text{ foci} / N \text{ inoculated oocysts}$ ), and  $19\% \pm 4\%$  based on direct counts ( $N \text{ foci} / N \text{ 3D-CC-IFA counted oocysts}$ ) of recovered oocysts. For 3D-CC-IFA method recoveries including upstream IMS, flow sorted oocysts were spiked into MilliQ water at the IMS step, resulting in recoveries of  $64\% \pm 9\%$  ( $n = 3$ ). For these samples, the percentage of infectivity with the indirect calculation was  $9\% \pm 0\%$ , and for the direct calculation it was  $14\% \pm 2\%$ . For Yamaska River water, IMS and 3D-CC-IFA recoveries of  $25\% \pm 19\%$  ( $n = 3$ ) were observed and infectivity varied from  $4\% \pm 3\%$  with the indirect calculation, to  $19\% \pm 15\%$  for the direct count. For Mille Iles River water, IMS and 3D-CC-IFA recoveries of  $41\% \pm 14\%$  ( $n = 2$ ) were obtained, and the infectivity varied from  $5\% \pm 1\%$  with the indirect calculation, and  $13\% \pm 3\%$  with the direct calculation (Table 4.2 and Figure 4.8).

Table 4.2: Impact of reference total oocyst count on the calculated percentage of infectious oocysts in experiments performed at various steps of the 3D-CC-IFA with spikes of flow cytometry sorted oocysts. Direct =  $((\text{foci} \times 100) / (\text{total oocyst post infection steps}))$  and Indirect =  $((\text{foci} \times 100) / (\text{total oocyst initially inoculated}))$ .

Matrix	Steps (n)	% Infectious oocysts		p-value
		DIRECT	INDIRECT	
		Ave (SD)	Ave (SD)	
MilliQ	3D-CC-IFA (10)	19 (4)	12 (1)	<< 0.001
MilliQ	IMS + 3D-CC-IFA (3)	14 (2)	9 (0)	< 0.01
Mille-lles	IMS + 3D-CC-IFA (2)	13 (3)	5 (1)	0.062
Yamaska	IMS + 3D-CC-IFA (3)	19 (15)	4 (3)	0.17

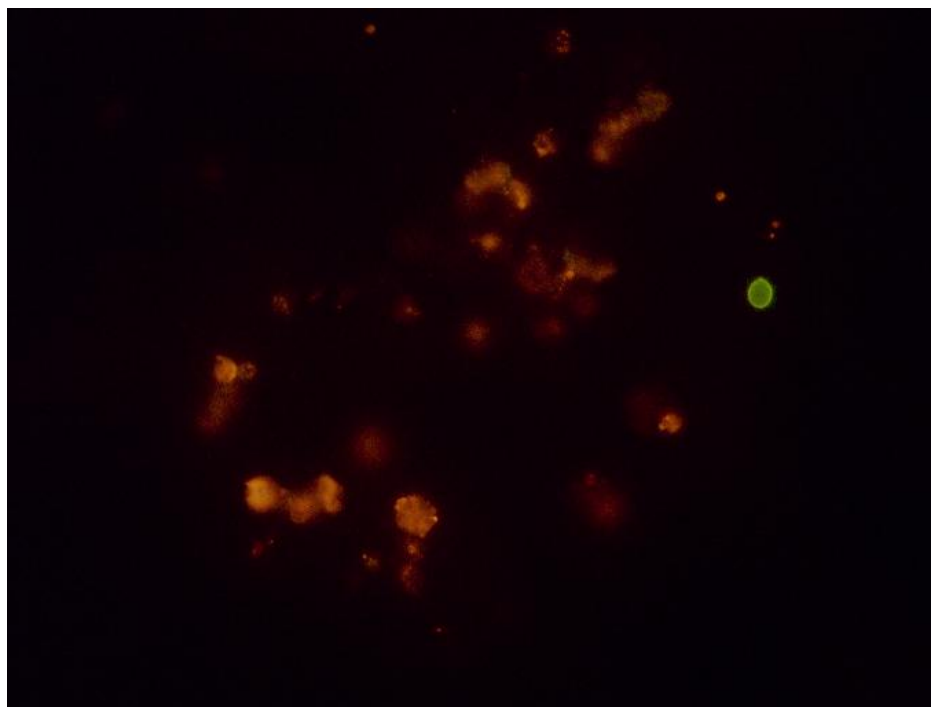


Figure 4.8: Superposed 3D-CC-IFA images (1000X magnification) of a *Cryptosporidium* cell culture infection focus stained with CY3-labeled Sporo-Glo antibody (red) and an oocyst stained with FITC-labeled GC Combo antibody (green).

## 4.5 Discussion

### 4.5.1 Impact of media selection on pretreatment

Most workers have obtained stimulation using acidified buffer amended with 1% trypsin and point out that trypsin acts as a pro excystation treatment (Hijjawi *et al.*, 2004), but the actual benefits of trypsin addition have not been assessed. Trypsin production in the digestive system takes place in the pancreas and is secreted through the pancreatic duct into the duodenum at a pH of about 8. Trypsin enzymatic activity peaks at pH values of 7-8 (Sipos and Merkel, 1970), and activity at pH 6 is less than 7% of peak activity. A protease active in the stomach at low pH such as pepsin (Bohak, 1969) appears to be a more feasible physiological enzymatic treatment. However, we found that the addition of proteases at low concentrations ( $\leq 0.5\%$  pepsin and  $2\%$  for trypsin) did not increase foci counts. In fact, acidity was the main stimulation trigger among all conditions tested. This is in agreement with a previous study (Kato *et al.*, 2001) which identified body temperature and stomach acidity (pH 1.5-3.5) as the key stimulating factors. The negative impact of a greater concentration of protease ( $\geq 1\%$  pepsin and  $2\%$  trypsin) was not the result of a pH change, since increasing protease concentrations did not modify sample pH ( $\leq 0.3$  pH). Therefore, our results suggest that protease activity is not a significant stimulation trigger. Excystation of *C. parvum* oocysts during cell culture pretreatment was shown to be marginal ( $\leq 1.3\%$ ), which is desirable in preventing damage to sporozoites during sample processing and inoculation of monolayers. However, only *C. parvum* was tested, and this is an intestinal species. Gastric species, such as *C. muris* and *C. andersoni*, can excyst in both acidic and neutral conditions. Since *C. parvum* and *C. hominis* are both intestinal species and the major human pathogenic *Cryptosporidium* species (Xiao and Ryan, 2004), we consider the low levels of excystation during cell culture pretreatment to have a negligible effect on the assay.

### 4.5.2 Addition of bile to the stimulation and infectious media

Bile had little or no effect when added to the stimulation or infection media. Stimulation media at a pH of 7.4 mimicked the physiological conditions of the small intestine, where bile enters the digestive tract. Kato *et al.*, (2001) suggested that bile salts could promote excystation. It was

hypothesized that bile addition to infection media would enhance oocyst excystation, especially after stimulation by acid. To our surprise, our results showed a clear decrease in foci counts when bile was added to the infection media. According to another study, sodium taurocholate enhanced the invasiveness of freshly excysted sporozoites by boosting their proteinic secretions and their gliding motility (Feng *et al.*, 2006).

### **4.5.3 Impact of media selection on infection**

The impact of glucose addition to the infection media was investigated by varying its concentration. When 50 mM was added, the infectivity rate increased. This finding is in agreement with those of Upton *et al.*, (1995), who reported that the addition of 50 mM of glucose increased the amount of parasite (total life stages) when compared to an addition of 20 mM. However, their counting method and infection criteria differed (parasite life stages counts vs. foci counts), and it is possible that the impact of glucose varies depending on the property assessed (invasion intensity vs. infection capacity). These authors also established that galactose, maltose, and mannose addition increased the number of parasites recovered. The addition of glucose at 50 mM to the infection media is also part of the method used in two environmental studies, but the benefits of glucose addition on foci counts were not investigated (Di Giovanni and LeChevallier, 2005; LeChevallier *et al.*, 2003). In this work, elevated concentrations of glucose (300 mM) in the infection media were found to inhibit foci counts. This concentration of glucose is greater than that commonly found in canned fruit juices and juice syrups, according to Health Canada (<http://205.193.93.51/cnfonline/>), and may be due to osmotic effects on sporozoites.

### **4.5.4 Oocyst loss in dual detection**

Enumeration of total and infectious oocysts were combined into a single assay (Dual Direct Detection and Cell Culture and Immunofluorescence Assay, 3D-CC-IFA) in order to minimize bias from split or paired (but different) samples. Early work suggested that only about 40% of inoculated oocysts are actually retained on cell monolayers when analyzing samples for infectious oocysts using the CC-IFA assay. To fully account for oocyst losses and to determine the method modifications required to minimize these losses, a mass balance approach was adopted, which included counting the oocysts in all sample processing waste streams of the CC-

IFA method. This mass balance revealed that the 3D-CC-IFA recovered  $68\% \pm 11\%$  of seeded flow cytometry sorted oocysts, out of which about 28% were found in post infection waste streams. In order to avoid the filtration of oocysts found in waste streams, several experiments were conducted to facilitate the adhesion of oocysts on cell monolayers. However, as describe bellow, these attempts were unfruitful. Future studies will be required to streamline the 3D-CC-IFA method in filtration steps.

#### **4.5.5 Factors affecting oocyst adhesion to the cell monolayer**

The addition of trypsin can increase the translucency of the oocyst wall and may degrade, modify, or rearrange the oocyst wall molecules and trigger the adhesion of oocysts, live and dead, on the cell layer (Smith *et al.*, 2005). However, in our study the addition of trypsin (1%) did not influence oocyst adhesion (data not shown), which was likely due to the reduced enzymatic activity of trypsin at low pH. The impact of viability on cell adherence was assessed. A controlled assay using UV-exposed oocysts was performed to verify whether or not non-viable oocysts still adhered to monolayers. It was hypothesized that oocyst viability could be a significant factor influencing adhesion, which would be a critical issue for the application of the 3D-CC-IFA method since the viability of environmental oocyst varies widely (King and Monis, 2007). Results indicated that UV-inactivation did not influence the number of oocysts retained on the cell monolayer. The effect of low-volume inocula was investigated with the objective of enhancing the contact between the oocysts and the cell monolayer. No significant improvements in oocyst adherence were observed. Other attempts to maximize oocyst adherence, such as addition of trypsin and longer infection duration (72, 96 and 120 h), did not improve oocyst adherence to cell monolayers or numbers of infection foci. The incorporation of the filtration count technique into the 3D-CC-IFA protocol appeared the best option for obtaining total oocyst counts and attempting an oocyst mass balance. The protocol allows for the recovery of about 70% of seeded oocysts, based on trials with flow cytometry sorted oocysts.

#### **4.5.6 Selection of antibodies for immunodetection in dual detection**

Although no statistical difference was observed between counts with FITC-labelled Crypt-a-Glo alone, or with Cy3-labeled Sporo-Glo<sup>TM</sup> and FITC-labelled GC Combo<sup>TM</sup> together, the latter

combination eased and clarified the counts. This combination is advantageous for analysts processing environmental samples, especially for the differentiation of life stages for samples with some interfering background staining.

#### **4.5.7 Benefits of the 3D-CC-IFA direct count method**

The 3D-CC-IFA method, with direct counting, allows for the enumeration of total and infectious oocysts for the same sample. For an indirect counting method, the total and infectious oocysts would have to be estimated using different samples (or splitting a sample), resulting in counts which are subject to different sources of losses and compounded errors. Method 1623 sample processing probably causes fewer oocyst losses and errors than the additional sample handling required for the infectivity assay. Therefore, the indirect counting method for estimating infectious oocyst fractions is likely not as accurate as a direct counting method, such as used for the 3D-CC-IFA method. Estimates of direct and indirect counts of 3D-CC-IFA and of IMS + 3D-CC-IFA were significantly different and highly reproducible when tested in MilliQ water (P value of  $<0.01$ ) and marginally significant in the Mille-Iles River matrix (P value of  $<0.07$ ). However, the high standard deviation for the Yamaska River prevented the detection of any significant difference, but average estimates were always considerably lower. Moreover, due to the low levels of oocysts in environmental waters, the use of paired samples brings additional error to these estimates, as previously reported for the detection of infectious and total oocysts. LeChevallier *et al.*, (2003) observed that out of 22 samples (from a total of 560 paired samples) testing positive for infectious oocysts using a cell culture PCR infectivity assay (CC-PCR), 21 tested negative for oocysts by Method 1623. This type of discrepancy can be expected due to the low levels and distribution of naturally occurring oocysts, as demonstrated by the authors using statistical modeling. Recent comparative trials of infectivity methods (Johnson *et al.*, 2005) have revealed that false positives are not common when using the CC-IFA method. Since the 3D-CC-IFA method uses a direct enumeration approach for total and infectious oocyst counts, it has a significant advantage over indirect methods for the analysis of environmental samples with low levels of naturally occurring oocysts.

#### 4.5.8 Recoveries of the 3D-CC-IFA in natural and MilliQ waters

Recoveries are a critical factor to take into account, as they may vary considerably from one water matrix to another. Significant matrix effects have been reported for the cartridge concentration step and the IMS steps for *Cryptosporidium* recovery from water (Connell *et al.*, 2000; Rochelle *et al.*, 1999). The proposed method for environmental waters using Envirochek-HV filter concentration, IMS purification and 3D-CC-IFA detection, shares its initial two steps with the USEPA Method 1623. Recoveries using Method 1623 for analysis of raw surface water samples vary widely and are often low, ranging from near 0 to almost 90% (Francy *et al.*, 2004; Kuhn *et al.*, 2002; McCuin and Clancy, 2005; Simmons III *et al.*, 2001). Envirochek filtration and IMS isolation remain major contributors to oocyst losses, and they are both recognized by the USEPA and the United Kingdom's Drinking Water Inspectorate (DWI, 2005) as procedural steps having oocyst loss. Turbidity is often, but not always, pointed to as being a major contributor to these variations (Francy *et al.*, 2004; Kuhn *et al.*, 2002; Rochelle *et al.*, 1999). In the current study, average 3D-CC-IFA recoveries for seeded river water from two different sources were 25% and 41%, and turbidities ranged from 10.3 to 13.5 NTU. The observed contribution of the IMS isolation step to losses is variable, and depend on the water matrix, as suggested previously (DiGiorgio *et al.*, 2002; Feng *et al.*, 2003). The 3D-CC-IFA method and US EPA 1623 method share the same concentration and purification steps and US EPA 1623 method recoveries are known to be highly variable as demonstrated in Figure 4.7. Recoveries in water sources are shown as examples of application and are expected to be highly variable depending on the matrix. In comparison to typical combined losses from the concentration and IMS separation steps, typical oocyst losses of 30% through the 3D-CC-IFA method appear acceptable, in light of the need to maintain homogeneous losses for the determination of the infectious fraction. The authors believe that once the oocysts are separated, concentrated and purified, that the matrix effect would not be significant at the cell culture step. Results using CC-IFA infectivity assessment methods have been shown to correlate with results from animal assays, providing an interesting alternative to animal trials (Rochelle *et al.*, 2002; Slifko *et al.*, 2002).

#### 4.5.9 3D-CC-IFA, for various *Cryptosporidium* species

3D-CC-IFA results and its applications in risk assessment will clearly be *Cryptosporidium* species dependant. Given that environmental samples may contain mixtures of oocysts from various species, the impact of speciation may be threefold: (i) the wide variety of potential infectivity for humans, (ii) the differing infectivity in cell culture, (iii) the level of reactivity to detection antibodies. The extent of this impact cannot be fully evaluated in control experiments at this time since most environmentally relevant *Cryptosporidium* species are not readily available. Isolation, purification and maintenance of various environmental species would have to be assayed in both cell culture and human trial in order to fully understand them. *C. parvum* and *C. hominis* are known to develop in cell culture (Johnson *et al.*, 2005) and are without hesitation the major pathogenic species to humans (Xiao and Ryan, 2004), thus the most relevant species for human risk assessment. Concerning the levels of human infectivity, cell culture methods are known to be an excellent surrogate to animal infectivity assays (Rochelle *et al.*, 2002) when tested with *C. parvum*. However, it has to be kept in mind that even within the same species, different isolates produced significantly different ID<sub>50</sub> in cell culture assays (Rochelle *et al.*, 2002) as well as in human trials (Chappell *et al.*, 2006; DuPont *et al.*, 1995). Potential differences in the level of reactivity to antibodies can be considered low. GC combo™ antibody detects many *Cryptosporidium* species in a previous study, including *C. andersoni*, *C. parvum*, Genotype W12, *C. muskrat* genotype I and II, *C. baileyi*, *C. cervine* genotype, *C. fox* genotype (Ruecker *et al.*, 2007). An overriding issue is that the Sporo-Glo™ antibody, which was developed using *C. parvum* sporozoite antigen, detects *C. parvum*, *C. hominis*, and *C. meleagridis* cell culture clusters of infection, but not infection caused by *C. andersoni* or *C. muris* (Johnson *et al.*, 2010) (G. D. Di Giovanni, pers. comm.). Therefore, the total oocyst count obtained by 3D-CC-IFA will include a broad range of oocysts from both human and animal-associated *Cryptosporidium* spp. and genotypes, but the count of infectious oocysts will likely only include those species of human health significance.



## 4.6 Conclusion

The combination of total and infectious oocyst counts for a single sample determined using the 3D-CC-IFA method provides an improved estimate of the infectious fraction of oocysts. It can be applied to the evaluation of environmental samples, reducing the cost and labour associated with a paired sample approach, and should provide better data for microbial risk analysis. If combined with the speciation of infection foci (i.e. infectious oocysts) and non-infectious oocysts present in samples; it would provide key information for risk assessment. Currently, other *Cryptosporidium* species shown to infect HCT-8 cells in vitro include *C. parvum*, *C. hominis* (Johnson *et al.*, 2010), and *C. muris* (Schets *et al.*, 2005). Further investigation of other *Cryptosporidium* species using the CC-IFA method will reveal whether or not this assay is limited in terms of detecting infectious oocysts of other species. The enumeration of total oocysts combined with a measurement of their infectious fraction, and in the future their speciation, will offer a sounder basis on which to assess risk and determine treatment requirements. This combination of information will enable the industry to better formulate water treatment strategies and, ultimately, lead to improved public health protection.

## 4.7 Acknowledgments

This study was funded by the NSERC Industrial Chair on Drinking Water at the École Polytechnique de Montréal. The Chair is jointly funded by the City of Montréal, John-Meunier/Veolia Water, the City of Laval and the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada. We also wish to thank Dr Normand Labbé for his scientific inputs and also Jacinthe Mailly, Mireille Blais and Mélanie Rivard for excellent technical support.

## CHAPITRE 5. PUBLICATION #2: TOTAL AND INFECTIOUS *CRYPTOSPORIDIUM* OOCYST AND *GIARDIA* CYST CONCENTRATIONS FROM DISTINCT URBAN AND RURAL CONTAMINATION SOURCES

Ce chapitre présente les concentrations totales et les fractions infectieuses de *Cryptosporidium* retrouvées dans différentes sources de pollution fécale ainsi que les concentrations totales et les fractions viables de *Giardia*. Dans un premier temps, l'optimisation des méthodes de concentration et d'isolation de ses parasites provenant de diverses matrices y est décrite. Par la suite, les performances des analyses sont documentées sous formes de taux de récupération pour les comptes totaux et de fractions infectieuses stables pour les résultats d'infectivité. Les résultats environnementaux de comptes totaux et infectieux de *Cryptosporidium* et de comptes totaux et viable de *Giardia* provenant d'échantillons d'eaux usées pour le milieu urbain et de fèces fraîches de bovins, leur fumier et des prélèvements d'eau de l'exutoire pour le milieu rural y sont par la suite détaillés. Ces résultats ont été soumis dans *Applied and Environmental Microbiology* en janvier 2011.

### TOTAL AND INFECTIOUS *CRYPTOSPORIDIUM* OOCYST AND *GIARDIA* CYST CONCENTRATIONS FROM DISTINCT URBAN AND RURAL CONTAMINATION SOURCES

**Cindy Lalancette<sup>1\*</sup>, Mylène Généreux<sup>2</sup>, Jacinthe Mailly<sup>1</sup>, Pierre Servais<sup>3</sup>, Caroline Côté<sup>2</sup>,  
 Aubert Michaud<sup>4</sup>, George D. Di Giovanni<sup>5</sup>, Michèle Prévost<sup>1</sup>**

<sup>1</sup> École Polytechnique de Montréal, Chaire Industrielle CRSNG en Eau Potable, Département des Génies Civil, Géologique et des Mines, CP 6079, Succ. Centre-ville, Montréal (Québec), Canada, H3C 3A7; <sup>2</sup> Institut de Recherche et de Développement en Agroenvironnement, 3300 Sicotte, Saint-Hyacinthe, Québec, Canada, J2S 7C6; <sup>3</sup> Écologie des Systèmes Aquatiques, Université Libre de Bruxelles, Campus de la Plaine, CP 221, Boulevard du Triomphe, B-1050 Bruxelles, Belgium; <sup>4</sup> Institut de Recherche et de Développement en Agroenvironnement, 2700 rue Einstein,

Sainte-Foy, Québec, Canada, G1P 3W8; <sup>5</sup> Texas A&M University System, Texas AgriLife Research Center at El Paso, Department of Plant Pathology and Microbiology, 1380 A&M Circle, El Paso, TX 79927-5020; \* Corresponding author : Mailing adress: École Polytechnique de Montréal, Chaire Industrielle CRSNG en Eau Potable, Département des Génies Civil, Géologique et des Mines, CP 6079, Succ. Centre-ville, Montréal (Québec), Canada, H3C 3A7. Phone: 514 340 4711 x 3711. Fax: 514 340 5918. E-mail: [cindy.lalancette@polymtl.ca](mailto:cindy.lalancette@polymtl.ca).

## 5.1 Abstract

*Cryptosporidium* and *Giardia* (oo)cyst concentrations are frequently determining factors for assessing drinking water safety from source to tap. Total count of (oo)cysts are widely used, but may not be accurate for human health risk characterization, since it does not provide infectivity information. The total counts and infectious fraction of *Cryptosporidium* and the total and viable counts of *Giardia* were assessed in major fecal pollution sources influencing drinking water supplies. Urban sources were sampled in the influent and effluent (n = 19, 18) of two wastewater treatment plants (WWTP). Peak concentrations were 533 oocysts L<sup>-1</sup> and 9 010 cysts L<sup>-1</sup> for influents and 89 oocysts L<sup>-1</sup> and 472 cysts L<sup>-1</sup> for effluents. Infectious oocyst fractions varied from below the detection limit (BDL) to 22% in the influent, and from BDL to 7% in effluents. The small rural sub-watershed selected is dominated by dairy cattle production. Fresh calf and cow feces, their manure, and the watershed discharge point were sampled. Median concentrations for total (oo)cysts were higher in calves (333 oocysts g<sup>-1</sup>; 111 cysts g<sup>-1</sup>) than in cows (52 oocysts g<sup>-1</sup>; 7 cysts g<sup>-1</sup>). At the discharge of the watershed, median concentrations of 177 oocysts 100 L<sup>-1</sup> and 32 cysts 100 L<sup>-1</sup> were measured. Infectious oocysts were found in 17 and 7% of calf and cow samples and none were found in manure or at the discharge point.

## 5.2 Introduction

*Cryptosporidium* spp. and *Giardia lamblia* (syn. *G. duodenalis*, *G. intestinalis*) are significant waterborne pathogens, accounting for 23.7 and 32% of protozoan drinking water outbreaks worldwide during the periods 1954-2002 and 1983-2001 (Karanis *et al.*, 2007). Increasingly rigorous regulations on its surveillance and removal have been implemented in numerous countries, such as the United States and England (Lake *et al.*, 2007; USEPA, 1998b, 2005a, b).

Zoonotic *C. parvum* and *G. lamblia* and anthropogenic *C. hominis* are commonly isolated from surface water (Percival *et al.*, 2004). Major sources of these pathogens include urban wastewater discharges (Quintero-Betancourt *et al.*, 2003; Ward *et al.*, 2002), livestock (Coklin *et al.*, 2007; Fayer *et al.*, 1998; Starkey *et al.*, 2005), and wildlife (Bednarska *et al.*, 2007; Jiang *et al.*, 2005b; Perz and Le Blancq, 2001). For urban discharges, the treated effluents of wastewater treatment plants (WWTP) (Gennaccaro *et al.*, 2003; McCuin and Clancy, 2006) or untreated effluents (bypass and combined sewer overflows (CSO)) (Gibson III *et al.*, 1998; Rechenburg *et al.*, 2006) constitute the major sources of fecal contamination.

As a consequence, additional specific *Cryptosporidium* monitoring is now required in source water in the US and in high risk sources in the UK. These requirements are based on an economic analysis of the risk of infection, which considers the concentration and fraction of infectious oocysts. The reference USEPA Method 1622/23 (USEPA, 2005b) provides a total oocyst count, but does not provide information on the species, the survival rate, or the infectivity of environmental oocysts (Di Giovanni *et al.*, 1999). Several published methods to estimate infectious oocysts, including cell culture with immunofluorescence assay (CC-IFA), cell culture with DNA PCR detection (CC-DNA), and cell culture with RNA RT-PCR detection (CC-RNA), were recently reviewed and systematically compared (Johnson *et al.*, 2010). Recently, the dual direct detection with cell culture and immunofluorescence assay (3D-CC-IFA) was developed to provide a cost-effective and feasible approach for enumerating total and infectious oocysts for individual, unsplit water samples (Lalancette *et al.*, 2010).

The main objective of this study was to estimate the levels of total and infectious *Cryptosporidium* oocysts in two major contributing sources of rural (dairy cattle facilities) and urban (sewage) fecal contamination. Additional goals included: (a) applying the new 3D-CC-IFA method to complex environmental samples, namely feces and sewage; (b) comparing the percentage of positive samples and concentrations of total and infectious *Cryptosporidium* and total and viable *Giardia* in dairy feces (cows and calves) and sewage (raw and treated). To our knowledge, this is the first report of direct measurements of total and infectious fractions of *Cryptosporidium* oocysts in individual sewage and animal fecal samples.

## 5.3 Materials and Methods

### 5.3.1 Description of sampling sites

Two WWTP using secondary biological treatment were chosen in the Greater Montreal Area (Canada). Both plants receive combined sewage with minor industrial flows, include primary settling, and do not disinfect or add coagulants. WWTP-S ( $47\,000\text{ m}^3\text{ d}^{-1}$ ) is equipped with aerated lagoons (AL) with an annual average hydraulic retention time (HRT) of 16 days. WWTP-V ( $20\,000\text{ m}^3\text{ d}^{-1}$ ) uses sequential bioreactors (SBR) with an annual average HRT of 7 h. Influent and effluents were grab sampled from February to November for WWTP-S (influent  $n = 11$ ; effluent  $n = 10$ ) and from April to November for WWTP-V (influent and effluent  $n = 8$ ) in 2009.

The rural Ruisseau au Castor sub-watershed ( $11.2\text{ km}^2$ ) is part of the Pike River watershed, and has an average discharge flow of  $633\text{ m}^3\text{ d}^{-1}$  during sampling period. The highest discharge flows were observed in April and the lowest in August. The area drained by this stream is mainly agricultural (97%), and is predominantly dedicated to dairy ( $n = 7$ ) and grain ( $n = 5$ ) production. Sampling period extended from June to November 2009 and 6 dairy farms were randomly samples. A total of 20 calf and 21 cow fresh feces samples were analysed and each sample represented a composite of 4 animals randomly chosen. Stream samples (40 liters;  $n = 10$ ) were randomly collected from June to November 2009, 50% were associated with dry weather conditions ( $< 1.1\text{ mm d}^{-1}$ ), typically related to the absence of significant contribution from surface runoff to stream discharge. From an operational perspective, sampling dates correspond to manure spreading operations on hay fields (June to September), small grain stubble (August and September) or following corn harvest (October-November).

### **5.3.2 Sample preparation prior to IMS separation for *Cryptosporidium* and *Giardia* analysis**

#### **5.3.2.1 WWTPs influents and effluents**

Wastewater samples were collected between 7:00 am and 9:00 am, without consideration of hydraulic residence time. The 4 L samples of the influent and effluent were kept at 4°C and analyzed within 24 h. Aliquots of 250 ml of each sample were repeatedly centrifuged at 2 000 g for 10 min without the break using a Sorvall® Legent RT, until pellets of 0.5 ml per analysis were obtained. Controls for recovery (100 prestained gamma irradiated *C. parvum* and *G. lamblia*; ColorSeed, BTF Pty. Ltd., North Ryde, Australia) and for infectivity (500 viable mouse propagated *C. parvum* Iowa isolate oocysts; Waterborne, Inc., New Orleans, LA) were added when necessary before the last centrifugation round.

#### **5.3.2.2 Fresh feces and manure**

The animals were not monitored for signs of disease and were randomly sampled. Fresh feces from four animals in each group (calves < 27 weeks and cows  $\geq$  27 weeks) were mixed in the randomly selected farms visited. Manure samples were also taken from both liquid management sources (n = 9) and solid management sources (n = 1). All samples were processed in the laboratory on the same day. A protocol was adapted from previous studies (Atwill *et al.*, 2006a; Davies *et al.*, 2003) using 0.5 g  $\pm$  0.02 g of fresh feces or manure. When controls were performed, oocysts or cysts were mixed overnight at 4°C with the 0.5 g samples. The feces were vortexed with 20 ml of Tris 50 mM 0.1% Tween 20 in 50 ml tubes until complete dispersion was observed. The samples were then shaken using a wrist action shaker (Barnstead Lab Line Multiwrist Shaker) at 900 rpm for 5 min and incubated at room temperature for 30 min. The homogenates were centrifuged at 2 000 g for 10 min and the supernatants carefully discarded. The resulting pellets were homogenized with 6 ml of Milli-Q water, and the suspensions were then filtered (Millipore Steriflip® 100  $\mu$ m, No. R7HN69592). Tubes and filters were rinsed with 2 ml of Milli-Q water, which was then combined with their filtrate. These 8 ml samples were pooled into a Leighton tube ready for purification via the IMS protocol described below.

### 5.3.2.3 Ruisseau au Castor surface water

Water grab samples (40 L) were collected at the outlet of the Ruisseau au Castor and processed the same day following USEPA Method 1623 (USEPA, 2005b). For each sample ( $n = 10$ ), the water was filtered using one Pall Envirochek HV cartridge (No. DN 12009) until the pressure reached 25 psi, for a maximum of 40 L. The last 10 liters were used to add oocysts and cysts controls for every sample. The controls (ColorSeed, BTF) were added to a beaker of 2 L of sampled water, and agitated with a stirring bar. After several minutes of agitation, the water was pumped through the filter and the beaker rinsed four times with 2 L of surface water, with each rinse pumped through filter. The loaded filters were then stored overnight at 4°C.

### 5.3.3 Immunomagnetic separation (IMS)

The IMS protocol was followed per manufacturer instructions (Dynabeads GC-Combo; Invitrogen, Carlsbad, CA) and USEPA Method 1623 (USEPA, 2005b), with the exception that it was divided into two steps in order to collect *Cryptosporidium* oocysts and *Giardia* cysts separately from each sample. Dynabeads anti-*Cryptosporidium* were first added to prepared samples, and Method 1623 followed up till the dissociation step, saving the supernatants from the first magnetic particle separation step. Oocysts were dissociated from IMS beads using acidified Hanks' balanced salt solution (catalog no. H9269; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) at pH 2.0 for 1 h at 37°C with vigorous vortex mixing for 10 s every 15 min as described for the 3D-CC-IFA protocol (Lalancette *et al.*, 2010). Dynabeads anti-*Giardia* were then added to the supernatants saved from the *Cryptosporidium* IMS, and *Giardia* cysts recovered by following Method 1623 (USEPA, 2005b), including 0.1 N HCl dissociation. Control experiments were conducted using combined high density spikes ( $2 \times 10^5$  *G. lamblia* and  $2 \times 10^5$  *C. parvum*, formaldehyde killed; Waterborne Inc.) in Milli-Q water, and demonstrated  $\leq 5\%$  of the oocysts and cysts were incorrectly separated (Dynabeads anti-*Cryptosporidium* 54 cysts: 1 036 oocysts and Dynabeads anti-*Giardia* 0 oocysts: 894 cysts counted in 3 fields at 400X).

### 5.3.4 Dual direct detection on a cell culture with immunofluorescence assay (3D-CC-IFA)

The full 3D-CC-IFA protocol has been detailed elsewhere (Lalancette *et al.*, 2010), but briefly described as follows. Oocysts were dissociated from IMS beads (and pre-treated for cell culture) as described in earlier section. Recovered oocysts were washed with infection medium and then seeded on HCT-8 cell monolayers for a 72 h incubation. Immunodetection of cell culture foci of infection used a primary antibody (#A600UN, Waterborne, Inc.; 0.24  $\mu$ L Ab: 150  $\mu$ L PBS per chamber slide; 1 hr incubation at RT) and an anti-rat secondary antibody (#F6258, Sigma-Aldrich; 0.68  $\mu$ L Ab: 150  $\mu$ L PBS per chamber slide; 1 hr incubation at RT). After these steps had been taken, the oocysts were immunodetected with EasyStain GC combo (BTF) diluted 1/10 in BFT Fixing Buffer. Microscopic counts were performed at a magnification of 400X (600X for samples with high background staining) using an Olympus BX51 microscope (Olympus, Tokyo, Japan) equipped with FITC (U-N51006) and CY3 (U-N4107A) filters.

### 5.3.5 Total *Giardia* counts

USEPA Method 1623 was followed (USEPA 2005b). IMS purified cysts were fixed with methanol on Dynal Spot-on slides (IDEXX No. 30201) and then stained with DAPI and EasyStain GC combo (BTF). Microscopic counts at 400X and at 1000X included FITC, DAPI, and differential interference contrast (DIC) observations.

## 5.4 Results

### 5.4.1 Recovery and Infectivity controls

Table 5.1 presents an overview of the results of the recovery and infectivity assays completed in six different wastewater and fecal matrices. The average infectivity of seeded viable *C. parvum* Iowa oocysts varied from 21 to 33% in the 3D-CC-IFA assays. Average recoveries for ColorSeed™ seeded samples varied from 12 to 30% for *Cryptosporidium* (3D-CC-IFA) and from 9 to 36% for *Giardia* (USEPA Method 1623). Average recoveries of total counts were applied on total lab measurements for RS, effluents, calf and cow feces and manure. Samples done at the



watershed discharge had recovery performed for every sampling. Infectivity controls were executed to show that matrixes and further laboratory manipulations had little impact on natural oocysts infectivity. As they are detected as a ratio, no correction was required from infectivity controls to environmental infectivity measurements.

Table 5.1: Environmental performances of 3D-CC-IFA as infectivity rates (foci counts reported on total counts) and total ColorSeed™ recoveries for *Cryptosporidium*, and of USEPA Method 1623 as a total ColorSeed™ recoveries for *Giardia*.

		<i>Cryptosporidium</i>		<i>Giardia</i>
		Infectivity rates of seeded viable <i>C. parvum</i> (%)	Seeded ColorSeed™ (%)	Seeded ColorSeed™ (%)
<b>Urban</b>	<b>WWTP Influent</b> (n=3, 4, 5)	27 (9)	18 (14)	13 (17)
	<b>WWTP Effluents</b> (n=2, 4, 5)	21 (5)	26 (25)	36 (26)
<b>Rural</b>	<b>Calf fresh feces</b> (n=3, 3, 3)	30 (15)	12 (5)	9 (10)
	<b>Cow fresh feces</b> (n=3, 3, 3)	33 (12)	19 (3)	30 (19)
	<b>Liquid manure</b> (n=1, 1, 1)	25	30	36
	<b>WS discharge</b> n=(NA, 10, 10)	NA	24 (11)	12 (14)

WWTP: wastewater treatment plant, WS: watershed, NA: not available

Percentages of recoveries are expressed in average with their standard deviation in parenthesis.

#### 5.4.1.1 Urban matrix total (oo)cysts and *Cryptosporidium* infectivity controls

When applied on samples from both studied WWTP, the 3D-CC-IFA method showed recoveries of  $18\% \pm 14\%$  for influents and  $26\% \pm 25\%$  for secondary treated effluents for total *Cryptosporidium* oocysts (p-value = 0.6). For *Giardia* cysts, the recovery efficiencies of  $13\% \pm 17\%$  for influents and  $36\% \pm 26\%$  for secondary treated effluents (p-value = 0.2). The influence of wastewater matrices on *Cryptosporidium* infectivity assay was assessed by seeding sample

with viable *C. parvum* Iowa oocysts strain. Infectivity rates (foci counts reported on oocysts counts) of  $27\% \pm 9\%$  were measured in influent, with similar rates of  $21\% \pm 5\%$  obtained for secondary treated effluents (p-value=0.5).

#### **5.4.1.2 Rural matrix total (oo)cysts and *Cryptosporidium* infectivity controls**

The 3D-CC-IFA methods provided average recoveries of  $12\% \pm 5\%$  for calf feces and  $19\% \pm 3\%$  for cow feces for total *Cryptosporidium* oocysts (p-value = 0.1). *Giardia* cyst recovery averaged  $9\% \pm 10\%$  for calf feces and  $30\% \pm 19\%$  for cow feces using 100 gamma irradiated cysts in 0.5 g of feces (p-value = 0.2). Matrix spikes were directly performed for every sample of surface water discharge analyzed using both 3D-CC-IFA and USEPA 1623 methods. For total *Cryptosporidium* oocysts, the 3D-CC-IFA method provided average recoveries of  $24\% \pm 11\%$ , and USEPA Method 1623  $12\% \pm 14\%$  for *Giardia*. Fractions of infectious *Cryptosporidium parvum* Iowa strain seeded were in the  $30\% \pm 15\%$  range in calf and in the  $33\% \pm 12\%$  range in cow feces.

### **5.4.2 (Oo)cysts from urban sources**

#### **5.4.2.1 Total *Cryptosporidium* and *Giardia* (oo)cysts**

*Cryptosporidium* concentrations ranged from BDL to 533 oocysts  $L^{-1}$  in influent, and from BDL to 89 oocysts  $L^{-1}$  in effluents and when combining both WWTP, they had positive samples of 47 and 56% respectively (Figure 5.1). *Giardia* concentrations varied from BDL to 9 010 cysts  $L^{-1}$  for influents, and from BDL to 472 cysts  $L^{-1}$  in effluents and when combining both WWTP, samples positive for both parasites ranged from 61 to 95% (Figure 5.1). BDL are variables since they reflected  $< 1$  oocyst reported on the volume sampled which represented the required amount of water to produce a pellet of 0.5 ml.

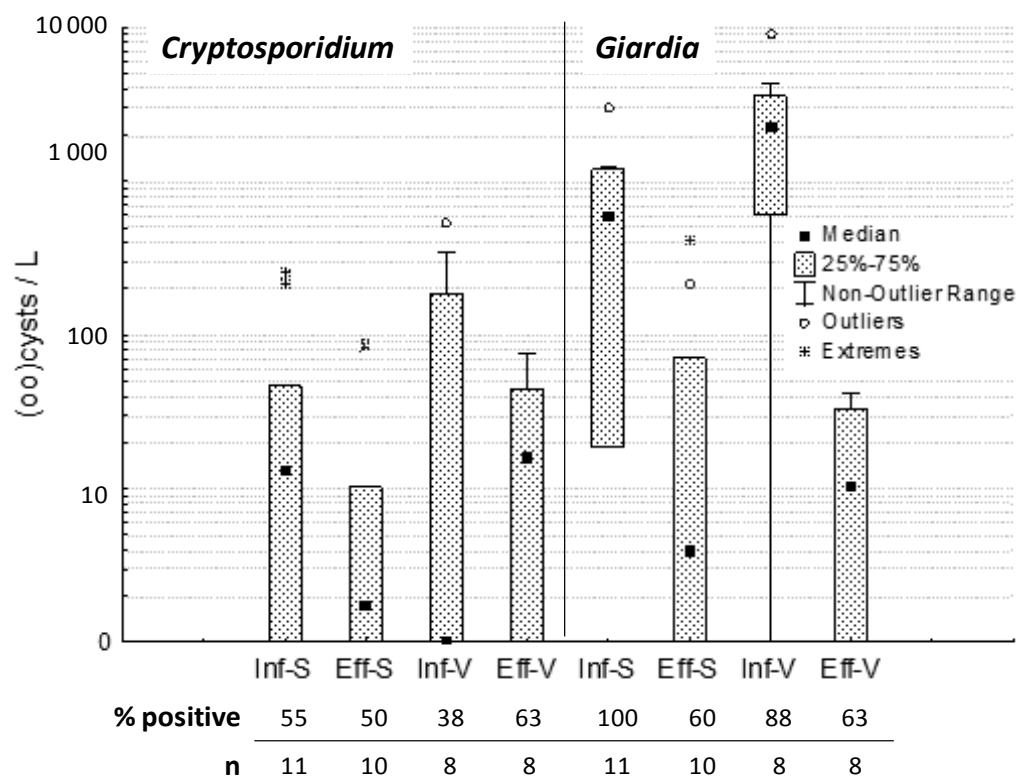


Figure 5.1: Concentrations and % positive samples of *Cryptosporidium* (3D-CC-IFA) and *Giardia* (USEPA Method 1623) in urban sewage sources (April to November, 2009) (data corrected for average recoveries performed for each matrix). Detection limits for both parasites varied from 1.5 to 4 (oo)cysts  $L^{-1}$  for influents and from 0.33 to 2 (oo)cysts  $L^{-1}$  for effluents.

#### 5.4.2.2 *Cryptosporidium* infectivity and *Giardia* viability

Figure 5.2 presents infectious oocyst fractions (3D-CC-IFA) ranging from BDL to 22% for combined influents with oocysts present in 0 to 33% of samples. In combined effluents, infectious fractions varied from BDL to 7% (aside from one extreme data point), with oocyst positive samples varying from 20 to 40%. The extreme data point happened in WWTP-V and contained 2 foci and 2 oocysts, which is close to detection limits. *Giardia* cysts detected by USEPA Method 1623 were considered viable when DAPI stained nuclei were observed (DAPI positive). In this study, we found high cyst viability (up to 100%) in both influents and effluents (Figure 5.2), with cysts present in 40 to 86% of samples.

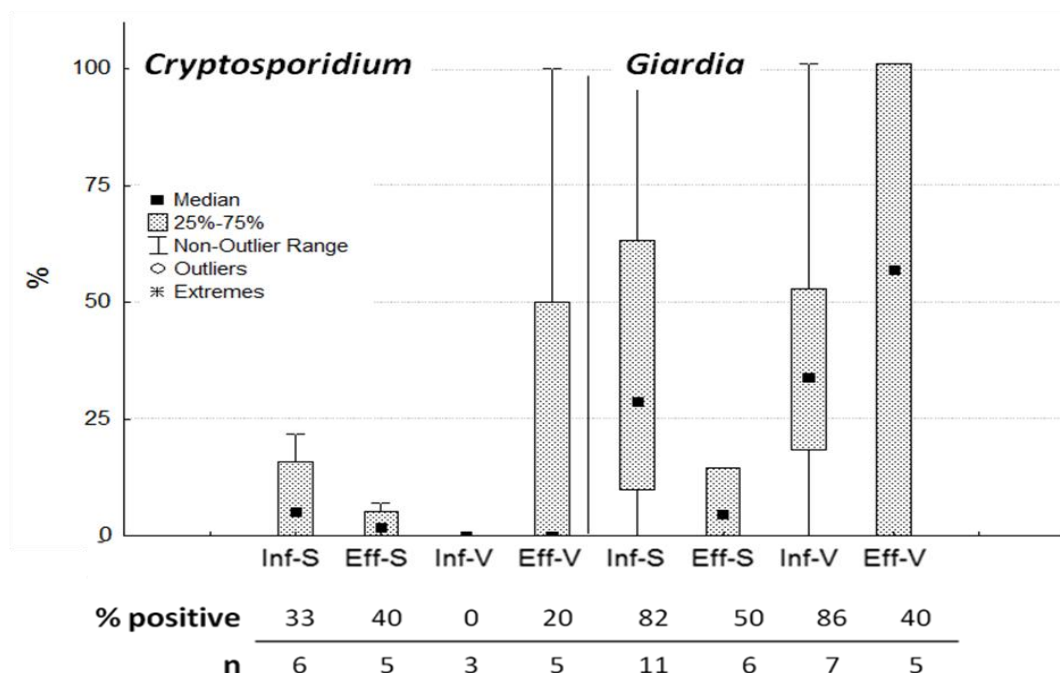


Figure 5.2: Fractions (%) of infectious *Cryptosporidium* (3D-CC-IFA) and *Giardia* viability (DAPI +) with “n” = number of positive samples, and “% positive” is the ratio of infectious oocysts counts reported to total positive counts.

### 5.4.3 (Oo)cysts from rural sources

#### 5.4.3.1 Total *Cryptosporidium* and *Giardia*

Figure 5.3 shows the oocyst concentrations found in various animal fecal sources and at a watershed stream discharge point. The median concentrations measured for *Cryptosporidium* in calf and cow feces were 333 and 52 oocysts  $g^{-1}$  respectively, and for *Giardia* 111 and 7 cysts  $g^{-1}$  respectively, and maximum concentrations reached 44 067 and 808 oocysts  $g^{-1}$  for *Cryptosporidium*, and 1 939 333 and 145 cysts  $g^{-1}$  for *Giardia*. A higher percentage of positive composite samples was noted in calf feces (90%) than in cow feces (71%) for *Cryptosporidium*, and marginally higher for *Giardia* (65% in calves and 57% in cows). In the watershed discharge,

median concentrations reached 177 oocysts 100 L<sup>-1</sup> and 32 cysts 100 L<sup>-1</sup>, and peaked at 1 500 oocysts 100 L<sup>-1</sup> and 100 cysts 100 L<sup>-1</sup>. Higher percentages of positive samples were also observed for *Cryptosporidium* (90%) than for *Giardia* (60%) in this discharge. Composite samples contained 47% and 60% of both cysts and oocysts in calf and cow feces.

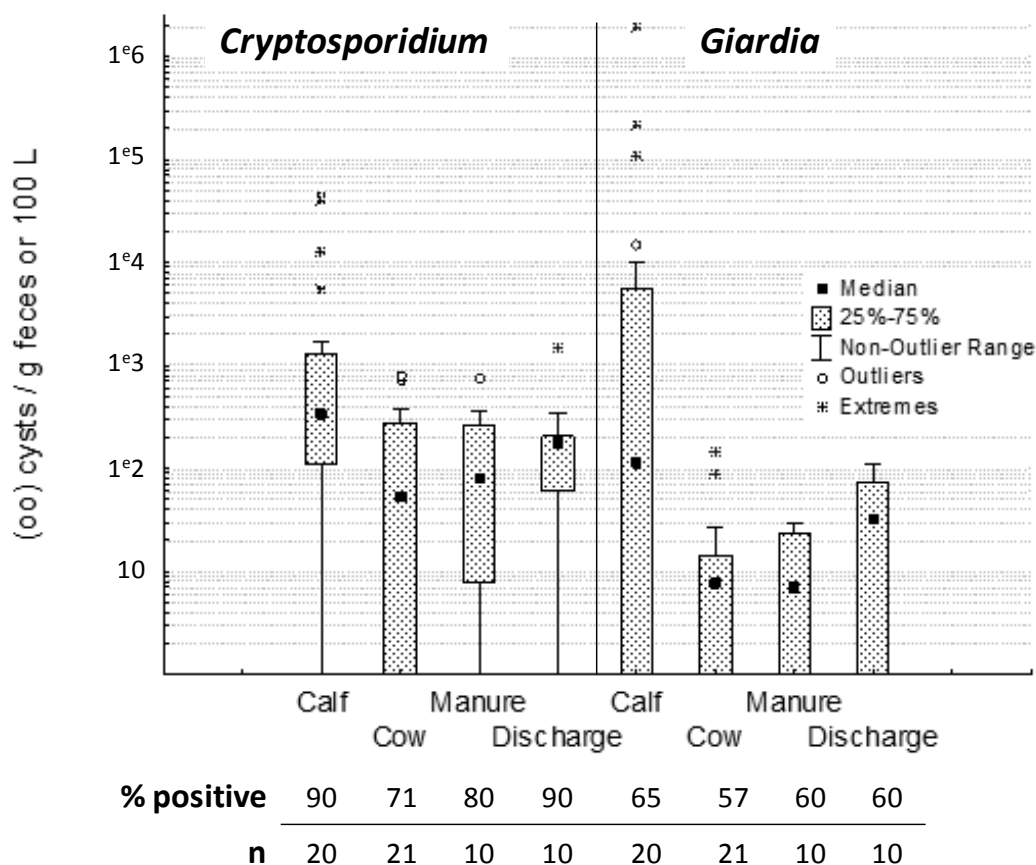


Figure 5.3: Concentrations and % positive samples of *Cryptosporidium* (3D-CC-IFA) and *Giardia* (USEPA 1623) in rural fecal sources (April to November, 2009) with data corrected for recovery (average recovery for each fecal matrix and daily recovery value for discharge samples). Calf, cow, and manure composite sample results expressed per g of feces and discharge results per 100 L. Detection limits were 2 (oo)cysts g<sup>-1</sup> for feces and manure, and ranged from 7 to 87 (oo)cysts 100 L<sup>-1</sup>.

### 5.4.3.2 *Cryptosporidium* infectivity and *Giardia* viability

The *Cryptosporidium* infectivity ratio and the percentages of positives for infectious oocysts in the dairy farms studied are presented in Figure 5.4. Low average infectious ratios of 3.4% for calves and 3.0% for cows were observed and sporadically, up to 29% in calf feces (93 foci /330 oocysts, 1/7, and 1/6) and up to 45% in cow feces (5/11). Also, higher infectivity rates and positive samples were found in calves (17%) than cows (7%). Interestingly, for four different calf samples taken at three different farms, and one sample taken from the watershed discharge, excysted oocysts with sporozoites were observed on the cell monolayer, but this presence did not lead to infectious foci development. Since only one life stage was observed, they were recorded as non infectious oocysts. These oocysts were smaller ( $n=17$ ;  $3.6 \times 4.3 \mu\text{m}$ ) than the control *C. parvum* Iowa oocysts ( $n=11$ ;  $4.4 \times 5.0 \mu\text{m}$ ). Typical foci were observed in control experiments performed with this calf fecal matrix seeded with *C. parvum* Iowa oocysts. Figure 5.4 shows that *Giardia* cyst viability peaked at 100%, with the percentage of positives ranging from 77 to 100% for calves and cows. No infectious oocysts were found in manure nor in the watershed although many oocysts were.

## 5.5 Discussion

### 5.5.1 Urban matrix total (oo)cysts recovery and *Cryptosporidium* infectivity controls

When applied on samples from both studied WWTPs, the 3D-CC-IFA method showed recoveries of  $18\% \pm 14\%$  for influents and  $26\% \pm 25\%$  for secondary treated effluents for total *Cryptosporidium* oocysts (Table 5.1). For *Giardia* cysts, the recovery efficiencies of  $13\% \pm 17\%$  for influent and  $36\% \pm 26\%$  for secondary treated effluents (Table 5.1) are consistent with prior reports of 27% for reclaimed effluents (Quintero-Betancourt *et al.*, 2003). Previous reports of recoveries of total *Cryptosporidium* (USEPA Method 1623) ranged from 26% in influent (McCuin and Clancy, 2006), to 25 and 53% in secondary effluents (McCuin and Clancy, 2005, 2006), to 32% in reclaimed effluents (Quintero-Betancourt *et al.*, 2003). Using various *Giardia* cysts purification and isolation methods, (Robertson *et al.*, 2000) reported recoveries from 30 to

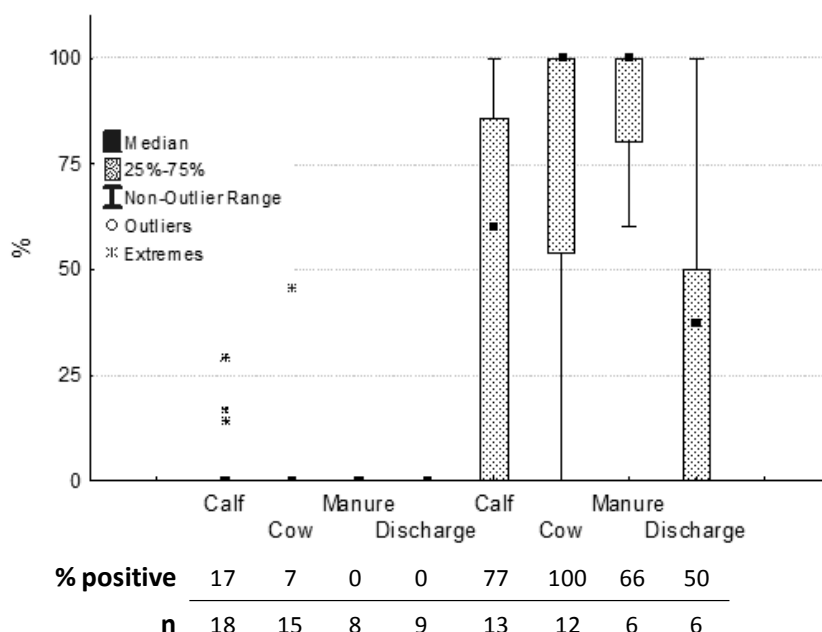


Figure 5.4: Fractions (%) of infectious *Cryptosporidium* (3D-CC-IFA) and viable *Giardia* (DAPI +). Calf and cow fresh feces are composite samples. “n” = number of positive samples, and “% positive” is the ratio of infectious oocyst counts reported to total positive counts.

85% in influent and 37 to 81% in wastewater effluents, with higher recoveries obtained when seeding high concentrations ( $5\,000\text{ cysts L}^{-1}$ ). Recoveries are known to vary with initially spiked concentrations in some datasets (Messner and Wolpert, 2002; Robertson *et al.*, 2000) and not in others (Pettersson *et al.*, 2007). Although our experimental recoveries fall within published values, some uncertainty remains due to the relatively small dataset. While small datasets may provide acceptable estimates of the mean value and the 95<sup>th</sup> percentile, recovery datasets of  $n > 20$  are suggested to reduce uncertainty for application of quantitative microbial risk assessment (QMRA) (Pettersson *et al.*, 2007). The influence of wastewater matrices on *Cryptosporidium* infectivity assay was assessed by seeding sample with viable *C. parvum* Iowa oocysts strain. Infectivity rates of  $27\% \pm 9\%$  were measured in influent, with similar rates of  $21\% \pm 5\%$  obtained for secondary treated effluents (Table 5.1). Previous testing in Milli-Q water showed similar rates (Lalancette *et al.*, 2010). Considering normal lot-to-lot variations in oocysts infectivity, infectivity rates were not significantly affected by the wastewater matrices.

### 5.5.2 Rural matrix total (oo)cysts recovery and *Cryptosporidium* infectivity controls

The 3D-CC-IFA methods provided average recoveries of  $12\% \pm 5\%$  and  $19\% \pm 3\%$  for calf and cow feces for total *Cryptosporidium* oocysts. The modifications to isolation and purification on the IFA method proposed by Davies *et al.* (2003) have been shown to improve separation results by up to 33% for calf feces and up to 37.5% for cow feces. Even using this improved separation technique; fecal matrices still caused significant interference with 3D-CC-IFA microscopy. Chamber slides were carefully screened, and oocysts and foci carefully observed, but background interference from sample debris was challenging. *Giardia* cyst recovery averaged  $9\% \pm 10\%$  and  $30\% \pm 19\%$  for calf and for cow feces. Higher average recovery rates of 76.4 to 97% were found for calf feces when spiking up to  $106 \text{ cysts g}^{-1}$  (Xiao and Herd, 1993), which is consistent with increased recovery rates with higher spiked concentrations (Robertson *et al.*, 2000). Surface water discharge obtained average recoveries of  $24\% \pm 11\%$  for total *Cryptosporidium* oocysts (3D-CC-IFA) and  $12\% \pm 14\%$  for *Giardia* (USEPA Method 1623). A large US study ( $n = 430$ ) sampling surface water at 87 drinking water intakes (DWI) and using USEPA Method 1623 found average recoveries of 43% for *Cryptosporidium* and 53% for *Giardia* (Connell *et al.*, 2000). Another review gathered data from 8 DWI and reported average recoveries varying from 12 to 50% for *Cryptosporidium* and from 6 to 47% for *Giardia* (Dechesne *et al.*, 2006). These higher recovery rates than those obtained in the present study were obtained in water of different nature (drinking water treatment plant intakes vs. agricultural discharge). We elected not to perform infectivity spikes, since this had been successfully achieved on surface waters of various qualities, and one set had been performed on surface water in a rural watershed ( $19\% \pm 15$ ,  $n = 3$ ) (Lalancette *et al.*, 2010). The fractions of infectious *Cryptosporidium parvum* in calf and cow feces ranged respectively in the  $30\% \pm 15\%$  and in the  $33\% \pm 12\%$ . Previous reports using the same procedure in Milli-Q water established an infectivity ratio of  $19\% \pm 4\%$  (Lalancette *et al.*, 2010). Therefore, overnight incubation at  $4^{\circ}\text{C}$  in fecal matrices did not appear to affect *C. parvum* infectivity.



### 5.5.3 (Oo)cysts from urban sources

#### 5.5.3.1 Total *Cryptosporidium*

*Cryptosporidium* concentrations ranged from below the detection limit (BDL) to 533 oocysts L<sup>-1</sup> in influent, and from BDL to 89 oocysts L<sup>-1</sup> in WWTP effluents (Figure 5.1). Our data are consistent with concentrations previously published for raw sewage influents (Lemarchand and Lebaron, 2003; McCuin and Clancy, 2006; Montemayor *et al.*, 2005; Robertson *et al.*, 2000) and WWTP effluents (Charles *et al.*, 2003; Huffman *et al.*, 2006; McCuin and Clancy, 2006; Montemayor *et al.*, 2005; States *et al.*, 1997). Extreme concentrations of up to 24 000 oocysts L<sup>-1</sup> in influent, 45 times higher than in this study (Robertson 2006), and up to 44 500 oocysts L<sup>-1</sup>, 500 times higher than in this study, in WWTP effluents (Robertson *et al.*, 2006; Robertson *et al.*, 2000) have been reported. Wide ranges of *Cryptosporidium* concentrations in raw sewage (1 000 to 10 000 oocysts L<sup>-1</sup>) and in WWTP effluents (10 to 1 000 oocysts L<sup>-1</sup>) may be expected based on QMRA modeling (Medema *et al.*, 2003). The prevalence of oocysts in this study varied from 38 to 55% of positive samples in raw sewage, and from 50 to 63% of positive samples in WWTP effluents, falling within the expected ranges of 30 to 100% previously documented (Charles *et al.*, 2003; Montemayor *et al.*, 2005; Quintero-Betancourt *et al.*, 2003; Robertson *et al.*, 2006; States *et al.*, 1997). Modest removals of oocysts for this study WWTP (< 2 log removal) are well supported by previous studies (Crockett, 2007; Robertson *et al.*, 2006; Rose *et al.*, 2004).

#### 5.5.3.2 Total *Giardia*

*Giardia* concentrations varied from BDL to 9 010 cysts L<sup>-1</sup> for raw sewage influents, and from BDL to 472 cysts L<sup>-1</sup> in WWTP effluents (Figure 5.1), which are within the published ranges of concentrations for raw sewage (Bertrand and Schwartzbrod, 2007; Payment, 2003) and effluents (Huffman *et al.*, 2006; Payment, 2003). Significantly higher concentrations were reported in some studies, up to 35 800 cysts L<sup>-1</sup> (4 times the maximum observed in this study) in raw sewage and up to 51 333 cysts L<sup>-1</sup> (100 times the maximum observed in this study) in effluents (Robertson *et al.*, 2006; Robertson *et al.*, 2000). A literature review reported that *Giardia* concentrations in influents range from 5 000 to 50 000 cysts L<sup>-1</sup>, and from 50 to 500 cysts L<sup>-1</sup> in WWTP effluents (Medema *et al.*, 2003). Previous measurements at WWTP-S showed higher

*Giardia* concentrations of 520 to 5 000 cysts L<sup>-1</sup> in raw sewage, and from BDL to 720 cysts L<sup>-1</sup> for plant effluents (Payment, 2003). Raw sewage prevalence ranged from 88 to 100% and from 60 to 63% in effluents, similar to the reported upper range of 100% for both types of water (Payment, 2003; Quintero-Betancourt *et al.*, 2003; Robertson *et al.*, 2006; Robertson *et al.*, 2000). Modest removals of cysts for both WWTP (< 2 log removal) are well supported by previous studies (Crockett, 2007; Payment, 2003; Robertson *et al.*, 2006; Rose *et al.*, 2004).

### 5.5.3.3 *Cryptosporidium* infectivity

Using the 3D-CC-IFA method, infectious oocyst fractions were assessed in wastewater influents and effluents. The 3D-CC-IFA method is able to detect oocysts of common human *Cryptosporidium* species, such as *C. parvum*, *C. hominis*, and *C. meleagridis*, but not animal associated species such as *C. andersoni* and *C. muris* (Johnson *et al.*, 2010; Lalancette *et al.*, 2010). As wastewater is considered to be the primary sources of human infectious oocysts in urban watersheds (WHO, 2009), sampling was designed to measure the infectious oocyst fraction in raw sewage influents and treated wastewater. Figure 5.2 presents infectious oocyst fractions ranging from 0 to 22% for combined influents with oocysts present in 0 to 33% of samples. In combined effluents, infectious fractions varied from 0 to 7%, with oocyst positive samples varying from 20 to 40%. Previous quantification of infectious oocysts using CC-FDM- MPN revealed 0.17-0.27 foci L<sup>-1</sup> (Quintero-Betancourt *et al.*, 2003) in reclaimed water, which is about 40 times lower than the influent levels and about 10 times lower than effluent levels in this study. Furthermore, these authors also cited the presence of *C. parvum* and *C. hominis* (Quintero-Betancourt *et al.*, 2003). Findings on the prevalence of infectious oocysts in wastewater influents and effluents were expected, given the fact that genotyping has confirmed the presence of human pathogenic oocyst species in sewage (Quintero-Betancourt *et al.*, 2003; Ward *et al.*, 2002). An estimated 37% of oocysts in surface water are based on a study using cell culture PCR (CC-PCR) (LeChevallier *et al.*, 2003). This approximation was then used as a reference to define the underlying distribution of infectivity in the model used by the US EPA to review the LT2 legislation (USEPA, 2005a). The infectious fraction inferred by LeChevallier *et al.* was obtained using a prevalence ratio of independent samples for infectious and total methods and the infectivity method (CC-PCR) had recently shown to produce false positive (Johnson *et al.*, 2010).

The US EPA applied a probability distribution mode of 40% for surface water samples. Lower human infectious ratios are expected since this ratio does not take into account oocysts speciation or its environmental die-off. Non human infectious species of *Cryptosporidium* have been reported in CSO (*C. baileyi*, *C. snake* and opossum 1-2 genotypes) (Ward *et al.*, 2002; Xiao *et al.*, 2000) and secondary effluents (*C. muris*), suggesting that numerous wildlife species may shed non human pathogenic oocysts. *C. parvum* and *C. hominis* were found to be prominent in wastewater by others (Quintero-Betancourt *et al.*, 2003; Ward *et al.*, 2002).

#### **5.5.3.4 *Giardia* viability**

Cysts detected by USEPA Method 1623 were considered viable when DAPI stained nuclei were observed (DAPI positive). However, similar to *Cryptosporidium*, the antibodies used for *Giardia* staining in Method 1623 also cannot discriminate genotypes, which mean human pathogenic and nonpathogenic *Giardia* species may be enumerated (Bertrand and Schwartzbrod, 2007). In this study, we found high cyst viability (up to 100%) in both influents and effluents (Figure 5.2), with cysts present in 40 to 86% of samples. However, DAPI staining should be viewed only as a marker of viability, and not considered an indicator of infectiveness. The plant with aerated lagoon treatment and average retention time of 16 days had a decreased effluent median cyst viability of 84%, while the treatment plant with sequential bioreactors and average retention time of only 7 hr had a 100% reduction in cyst viability. Human infectious *G. duodenalis* cysts from assemblages A (also found in cats and dogs) and B (also found in dogs and rats) had been identified in two WWTP (Bertrand and Schwartzbrod, 2007; Thompson, 2004).

### **5.5.4 (Oo)cysts from rural sources**

#### **5.5.4.1 Total *Cryptosporidium* and *Giardia***

Figure 5.3 shows the oocyst concentrations found in various animal fecal sources and at a watershed stream discharge point. To our knowledge, studies describing the concentration of oocysts in dairy cattle feces have only been performed in calves, and not in adult dairy cows, with concentrations reaching as high as  $10^7$  oocysts  $g^{-1}$  (Fayer *et al.*, 1998; Starkey *et al.*, 2005). Wide variations from not detected to  $10^7$  oocyst  $g^{-1}$  have been reported using methods offering diverse detection limits, as high as 1 oocyst  $g^{-1}$  (Starkey *et al.*, 2005). No oocyst enumerations of cattle

feces from infected cows have been reported, but a lower prevalence (up to 21%) has been established (Huetink *et al.*, 2001). Starkey *et al.*, in 2007 applied a wide gamma distribution (0.4856; 383 745) to describe the measured concentration of oocysts in calves (< 2 months), and then used an inferred lognormal distribution (36.0; 28.2) for adult cows (> 2 months). Although adult cattle are mainly infected by species that are non pathogenic to humans (Fayer and Xiao, 2007), the proportion of adult cattle in herds is significant and its impact on oocyst loadings is significant. In the watershed studied, the average point estimates of daily oocyst loads from 742 adult cows (> 6 months) represent  $1.6 \times 10^9$  oocysts d<sup>-1</sup>, as opposed to  $1.2 \times 10^9$  oocysts d<sup>-1</sup> for the 112 calves (< 6 months). In surface water with predominantly agricultural contamination, the prevalence of *Cryptosporidium* was estimated at 77%, with concentrations varying from not detected to 440 oocysts 100 L<sup>-1</sup> (Isaac-Renton *et al.*, 2005; Ong *et al.*, 1996; Ruecker *et al.*, 2007; Wilkes *et al.*, 2009), while *Giardia* concentration varied from BDL to 2 200 cysts 100 L<sup>-1</sup>, with a prevalence of up to 44% (Isaac-Renton *et al.*, 2005; Ong *et al.*, 1996; Wilkes *et al.*, 2009). Using a large database of 823 measurements in a rural watershed, Wilkes *et al* (2009) showed marked increases in the prevalence of *Giardia* in the fall, 42% vs 9 to 12% in the spring and summer, and that of *Cryptosporidium* in the fall (72%) vs 17 to 19% in the spring and summer. In a study presented by Isaac-Renton *et al* (2005), peak contamination by *Cryptosporidium* occurred in an agricultural watershed in both spring and fall. Although cattle is the main oocyst input source in this watershed, other sources, such as wildlife (mice, rats, muskrat, deer, birds), humans, and companion animals (cats and dogs), can contribute (Ruecker *et al.*, 2007). Composite samples containing both cysts and oocysts reached 47% of calf and 60% of cow feces respectively. Although coinfection cannot be assessed in composite samples, it is common in calves (Thompson *et al.*, 2003). In the present study, results of total oocyst concentrations in cow feces and manure after storage of undetermined duration were equivalent. This is not surprising, given the fact that cows represent the dominant source of feces. Storage in manure tanks did not reduce the concentration of oocysts. Summertime storage is typically short-term under varying conditions reflecting manure usage by the producer. Thermophilic windrow composting and anaerobic digestion have been shown to decrease the concentration and the infectivity of oocysts (Garcés *et al.*, 2006; Van Herk *et al.*, 2004). The reduction is influenced by contact time,

moisture, oocyst concentration, and ammonia, but elevated temperature was determined to be the critical factor (Finstain, 2004).

#### **5.5.4.2 *Cryptosporidium* infectivity and *Giardia* viability**

The *Cryptosporidium* infectivity ratio and the percentages of positives for infectious oocysts in the dairy farms studied are presented in Figure 5.4. Low average infectious ratios of 3.4% for calves and 3.0% for cows were observed. The low infectious fraction found in the fresh feces most probably reflects the dominance of non human pathogenic species, especially the dominance of *C. andersoni* in cow (Santin *et al.*, 2004). However, these average ratios are misleading, since they reflect a majority of samples with no detected foci. In fact, very high infectious fractions, up to 29% in calf feces and 45% in cow feces, reveal the sporadic presence of individual animals shedding high levels of human pathogenic species, as detected by 3D-CC-IFA. These high fractions exceed the range typically reported for laboratory reference strains (Lalancette *et al.*, 2010) and reveal the possible presence of strains highly infectious to humans within a population of dairy cattle. The 3D-CC-IFA results clearly support these high estimates, as they are based on a sufficient number of clear microscopic observations of both infectious foci and oocysts in these composite samples. As expected, higher infectivity rates and positive samples were found in calves (17%) than cows (7%). *C. parvum* is the dominant species infecting calves (Broglia *et al.*, 2008; Fayer and Xiao, 2007; Santin *et al.*, 2004) and is readily discriminated by 3D-CC-IFA (Lalancette *et al.*, 2010). Several studies have shown that cows can harbor a *C. parvum* infection, with a prevalence of 1% in post weaned calves (Santin *et al.*, 2004) and in fecal material from a feed lot pen (Atwill *et al.*, 2006b). Our results show that, when infected with an appropriate species, an adult cow can shed oocysts that are potentially very infectious to humans. The low infectious fraction from the fresh feces most certainly reflects the dominance of non human pathogenic species expected to be found in calves and cows.

For *Giardia*, the estimates of viability were expected to be high, since they are based on the presence of nucleic acid, a less stringent criterion than the capability of forming infectious foci on human cell lines. Figure 5.4 shows that *Giardia* cyst viability peaked at 100%, with the percentage of positives ranging from 77 to 100% for calves and cows. While viable, the human health risk significance of these findings should be considered with caution. Indeed, livestock

assemblage E is the dominant *G. duodenalis* genotype found in cattle, and the human pathogenic *G. duodenalis* genotype assemblage A only accounts for a small fraction (< 0.5 to 17%) of cattle infections (Appelbee *et al.*, 2003; O'Handley *et al.*, 2000). Based on a review of several molecular epidemiology studies conducted on diverse hosts, (Thompson *et al.*, 2003) conclude that the public health risk from cattle to water sources may be minimal, at least in North America and Australia, where genotyping has been undertaken and has confirmed the predominant presence of the livestock genotype.

Our sampling strategy, using fresh fecal material, was aimed at maximizing the likelihood of obtaining positive samples in order to establish relative infectious fractions, not to quantify apparent herd prevalence. Therefore, composite samples were taken of feces from four animals. This precludes the exact estimation of infection prevalence in calves and cows, but the proportion of positive composite samples can be used to estimate ranges of apparent prevalence over the course of the five months of sampling. The proportion of *Cryptosporidium* positive composite samples range from 71 to 80% in fresh cow feces and in liquid or solid manure samples, and reached 90% in fresh calf feces. A similar trend was observed for *Giardia* cysts, with 57 and 60% of samples of fresh cow feces and liquid or solid manure testing positive, and reaching 65% in fresh calf feces. Because the samples are composites, these ranges may translate into lower apparent prevalence (up to 25% of the observed value). For estimates of infectious fractions, composite samples may provide a better cost-effective and feasible approach than testing individual samples.

No infectious oocysts were found in the watershed discharge (Figure 5.4), although oocysts were almost always present in significant concentrations. The survival of parasites in soil following manure spreading is influenced by soil humidity, porosity, pH, and texture (Ramirez *et al.*, 2009; Zarlenga and Trout, 2004). The absence of infectious oocysts at our discharge point reflects both the expected dominance of non human infectious species and environmental attenuation. The cumulative attenuation resulting from storage and environmental exposure in the field certainly reduced the already low infectious fraction observed in fresh feces. In similar watersheds, *Cryptosporidium* was frequently found in surface water, although human pathogenic species were rarely found, with *C. andersoni* being the most frequently isolated species (Ruecker *et al.*, 2007). Wildlife, humans, and companion animals can also be sources of *C. parvum* (Xiao and Ryan,

2004). However, in this watershed, these sources are likely to represent an insignificant volume of feces when compared to the loadings from the dairy production. Moreover, although *C. parvum* and *C. hominis* are the main species reported in human clinical isolates from urban and rural areas (Fayer and Xiao, 2007), *C. hominis* is the dominant species found in specimens from urban residents (Llorente *et al.*, 2007). The lower positive and median concentrations of *Giardia* cysts at the watershed discharge point, when compared to those found in fresh feces and manure, also suggest significant environmental decay.

## 5.6 Conclusions

In this study, the fractions of infectious oocysts were assessed directly for environmental water and fecal matrices, using the 3D-CC-IFA method. The 3D-CC-IFA infectivity measurements provide more accurate data for QMRA than simple estimates based on total microscopic oocyst counts and assumptions of human infectious fractions. In urban sources, *Cryptosporidium spp.* and *Giardia spp.* were commonly isolated from raw sewage ( $< 550$  oocysts and  $< 10\,000$  cysts  $L^{-1}$ ) and at lower concentrations ( $< 90$  oocysts and  $500$  cysts  $L^{-1}$ ) in the effluents of the two WWTP. Infectious foci were observed in 20% of the samples, and the percentages of infectivity did not rise above 22% for raw sewage and 7% for WWTP effluent (with one exception). In rural sources, *Cryptosporidium spp.* and *Giardia spp.* were commonly found in calves and cows but, more importantly, the oocysts were not often found to be infectious using 3D-CC-IFA, indicating a lower human health risk for these sources. Calves had sporadically higher concentrations of both parasites than cows, and the proportion of infectious samples was higher in calves than in cows. Manure generally contained parasites, but no infectious oocysts were detected. Discharge from the studied rural watershed contained both parasites in significant concentrations (BDL to  $1\,518$  oocysts  $100\,L^{-1}$  and BDL to  $10^8$  cysts  $100\,L^{-1}$ ), but no infectious oocysts were isolated. *Cryptosporidium spp.* was the most prevalent in rural pollution sources, as was *Giardia* in urban pollution sources. In both rural and urban pollution sources, the presence of human infectious oocysts was limited and when present, they were most of the time below the 40% commonly used. Data collected in this study are currently being used to refine QMRA models for the studied watersheds. A similar approach as taken in this study may prove useful for refining risk assessments for other watersheds.

## **5.7 Acknowledgments**

This study was supported by the NSERC Industrial Chair on Drinking Water at the École Polytechnique of Montréal, which is jointly funded by the City of Montréal, John-Meunier/Veolia Water, the City of Laval, and the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada. We also thank Mireille Blais and Mélanie Rivard for their excellent technical support and input.



## **CHAPITRE 6. PUBLICATION #3: CONCENTRATIONS AND MASS LOADINGS OF TOTAL AND INFECTIOUS *CRYPTOSPORIDIUM* OOCYSTS IN URBAN AND RURAL SOURCES**

Ce chapitre présente les nouvelles modélisations des charges d'oocystes totaux et infectieux issues de sources de pollution urbaine et rurale de *Cryptosporidium*. Dans un premier temps, la démonstration des faibles rapports qu'entretiennent les oocystes avec les indicateurs est établie par une revue de littérature, par leurs enlèvements dans les STEP, par des ratios différenciant les contaminations urbaines et rurales et par leur transport via le lessivage des sols agricoles. Par la suite, des scénarios de charges quotidiennes d'oocystes totaux et infectieux émises par humain équivalent et par animal équivalent sont développés. Cette nouvelle approche pourra servir à mieux saisir les différences de risque entre les oocystes provenant de milieux urbains et ruraux. Ces résultats seront soumis pour publication dans *Water Research* en mars 2011.

### **CONCENTRATIONS AND MASS LOADINGS OF TOTAL AND INFECTIOUS *CRYPTOSPORIDIUM* IN URBAN AND RURAL SOURCES.**

**Cindy Lalancette<sup>1</sup>\*, Pierre Servais<sup>2</sup>, George D. Di Giovanni<sup>3</sup>, Michèle Prévost<sup>1</sup>**

<sup>1</sup> École Polytechnique de Montréal, Chaire Industrielle CRSNG en Eau Potable, Département des Génies Civil, Géologique et des Mines, CP 6079, Succ. Centre-ville, Montréal (Québec), Canada, H3C 3A7; <sup>2</sup> Écologie des Systèmes Aquatiques, Université Libre de Bruxelles, Campus de la Plaine, CP 221, Boulevard du Triomphe, B-1050 Bruxelles, Belgium; <sup>3</sup> Texas A&M University System, Texas AgriLife Research Center at El Paso, Department of Plant Pathology and Microbiology, 1380 A&M Circle, El Paso, TX 79927-5020; \* Corresponding author : Mailing adress: École Polytechnique de Montréal, Chaire Industrielle CRSNG en Eau Potable, Département des Génies Civil, Géologique et des Mines, CP 6079, Succ. Centre-ville, Montréal (Québec), Canada, H3C 3A7. Phone: 514 340 4711 x 3711. Fax: 514 340 5918. E-mail: [cindy.lalancette@polymtl.ca](mailto:cindy.lalancette@polymtl.ca).

## 6.1 Abstract

Assessing the presence of human pathogenic *Cryptosporidium* oocysts in surface water remains a significant water treatment and public health challenge. Most drinking water purveyors rely on a combination of turbidity and microbial indicators and avoid parasite quantification which is labour intensive, tedious and costly. However, the use of indicators has significant limitations in predicting the presence, concentration, transport, removal and die-off of *Cryptosporidium*. As sewage discharge from urbanized area and dairy cattle production from rural environment are the two major sources of human infectious *Cryptosporidium*, total and infectious oocysts were quantified in urban sources (raw sewage and secondary treated wastewater) and rural sources (feces and sub-watershed stream discharge) along with *Giardia* cysts, microbial indicators, turbidity and hydrological data over a period of six months. Results show lower removals of oocysts by wastewater treatment (medians: 0.6-0.8 log) when compared with observed removals of turbidity and TSS (medians: 1.0-1.2 log) and indicators (medians: 1.9-4.6 log). Cumulative 5 days average precipitation was linearly correlated ( $r^2 = 0.63$ ) with the loading of oocysts in a rural stream but exponentially ( $r^2 = 0.69$ ) with observed concentrations. Relationships between the various parasites and indicators confirm their predictive limitations in the sources studied. Using a Monte Carlo approach, the distributions of loadings and concentrations of total and infectious *Cryptosporidium* were estimated. Results provide insight to watershed managers to better manage the risks of infectious oocysts in surface waters.

## 6.2 Introduction

*Cryptosporidium* is one of the most frequently identified etiologic agents associated with drinking waterborne illness in the United States (US) (Craun *et al.*, 2006), the European Union and in England and Wales (Karanis *et al.*, 2007). In reaction to the threats posed by its oocysts, increasing rigorous regulations on its surveillance and removal were promulgated in the US and in England (Lake *et al.*, 2007; USEPA, 1998b, 2005a, b). In the US, requirements for its removal during treatment are based on the estimation of total oocysts in raw water, and the average

annualized incremental treatment costs associated with those increased requirements have been estimated to range from \$92 million to \$133 million (USEPA, 2005a).

The reference method to assess the presence of *Cryptosporidium* in natural water, USEPA Method 1622/23 (USEPA, 2005b) provides a total oocyst count that does not provide information on the species, the survival nor the infectivity of environmental oocysts (Di Giovanni *et al.*, 1999). Several published methods to estimate infectious oocysts including Cell Culture with Immunofluorescent Assay (CC-IFA), with DNA PCR detection (CC-DNA), with RNA RT-PCR detection (CC-RNA), were recently reviewed and systematically compared (Johnson *et al.*, 2010). This comparison revealed that more frequent false positive measurements are observed for cell culture method when combined with DNA detection and poor reproducibility when CC is combined with RNA detection. The CC method combined with the IFA assay proved the most robust and transferable. From these findings, an improved method allowing the quantification of the *Cryptosporidium* infectious oocysts fraction was recently optimized in terms of stimulation and infection media and further developed to address the issue of split sampling of rare heterogeneous events (Lalancette *et al.*, 2010). Specifically, the Dual Direct Detection with Cell Culture and Immunofluorescent Assay (3D-CC-IFA) calls for counting oocysts remaining on the cell monolayer and oocysts recovered from the cell monolayer washes during processing using a simple filtration technique. With the 3D-CC-IFA method, estimates of total and infectious oocysts are derived from the same sample. Direct percentages of infectivity can then be calculated which will provide for more accurate infectious fractions and improved risk estimates (Lalancette *et al.*, 2010). Considering the high concentrations and prevalence in wastewater and animal feces, and in light of their environmental robustness (King and Monis, 2007), it is not surprising to observe wide ranges of prevalence (44-70%) and concentrations (0.005-20 oocysts L<sup>-1</sup>) of *Cryptosporidium sp* oocysts in rural and urban surface waters (Isaac-Renton *et al.*, 2005; Messner and Wolpert, 2002; Ong *et al.*, 1996; Ruecker *et al.*, 2007; Wilkes *et al.*, 2009). To assess the microbial quality of surface water, most regulations rely on microbiological fecal indicators (Ashbolt *et al.*, 2001; Tallon *et al.*, 2005) that have wide recognition and application and are based on sound practical principles (Ashbolt *et al.*, 2001). As parasite enumerations are costly and tedious, correlations with selected physical and microbiological indicators are

desirable and have been investigated. Table 6.1 presents selected studies assessing the relationships between *Cryptosporidium* and various microbial and environmental indicators. Concentrations of *Cryptosporidium* were found to correlate ( $r = 0.8$ ) with concentrations of somatic coliphage (Fu *et al.*, 2010) and *E. coli*, fecal streptococci and total coliforms ( $r > 0.8$ ) in raw sewage (Reinoso *et al.*, 2008). However, several studies report no correlations with total and fecal coliforms, *E. coli*, *C. perfringens*, fecal streptococci and *Enterococci*, enteric virus and rainfalls in raw and treated sewage as well as in CSO (combined sewer overflow) (Fu *et al.*, 2010; Gibson III *et al.*, 1998; Rose *et al.*, 2004; Wohlsen *et al.*, 2006). In lake or reservoir surface water, moderate correlations ( $r = 0.4-0.7$ ) were observed with rainfall (Schets *et al.*, 2008). Average concentration of *E. coli*  $> 10$  UFC  $100\text{ ml}^{-1}$  has been used as an indicator of high concentrations ( $> 0.075$  oocysts  $\text{L}^{-1}$ ) of *Cryptosporidium* (McGuire *et al.*, 2002). In river water, correlations ( $r > 0.6$ ) were noted with *C. perfringens* concentrations (Atherholt *et al.*, 1998; Payment and Franco, 1993). Also, the absence of *E. coli* has been linked to the absence of *Cryptosporidium* oocysts (Wilkes *et al.*, 2009) and a trigger concentration of 50 UFC  $100\text{ ml}^{-1}$  has been associated with a probability of elevated concentrations of oocysts (McGuire *et al.*, 2002). Concentrations of oocysts and *E. coli* varied significantly during the year but peak seasons did not coincide (Isaac-Renton *et al.*, 2005). Variations of turbidity resulting from runoff due to precipitations, were correlated ( $r > 0.5$ ) with *Cryptosporidium* concentrations (Atherholt *et al.*, 1998), but the level of concentrations were strongly influenced by land use (Kistemann *et al.*, 2002). Still, following the occurrence of unusual flooding, the amount of turbidity were reported to be higher during annual low river flows occurring from June to October ( $> 1.0$  NTU) than during annual high flows of November to May (0.4-0.6 NTU), suggesting a relative constant runoff input diluted in different water volumes (Atherholt *et al.*, 1998). However, modeling estimated that a single 12 h runoff event represent 3-4% of the total annual load of *Cryptosporidium* in different catchment areas influenced by wildlife, agricultural and human waste (Kistemann *et al.*, 2002). The transport of indicators, and by extension of pathogens, is reduced by the presence and continuity of buffer strips, and their efficacy is more clearly evidenced by peak pathogen concentrations and loadings during storm events (Cinque, 2009). Finally, elevated effluent turbidity of drinking water treatment plant are indicative of treatment breakthrough (Mac Kenzie *et al.*, 1994) and drinking water regulations rely on the removal of

Table 6.1: Selected studies associating bacterial, viral and physical indicators to *Cryptosporidium* oocysts in various types of matrixes.

Matrix	Microbial or environmental indicators	Association	Conclusions	References
WWTP	Heterotrophic counts Total and Fecal coliforms Phages	Concentration	Data from all treatment steps: - Correlated with somatic coliphage ( $r=0.8$ ) - No corr. with heterot. counts, total and fecal coliforms	(Fu <i>et al.</i> , 2010)
	<i>C. parfringens</i> <i>Enterococci</i> Total and Fecal coliforms Enteric virus Phages	Removal through biological, filtered and disinfected effluents	No correlation	(Rose <i>et al.</i> , 2004)
Raw sewage	<i>E. coli</i> Fecal streptococcus Total coliforms	Not mentioned	Correlated with <i>E. coli</i> , fecal streptococci, total coliforms ( $r > 0.8$ )	(Reinoso <i>et al.</i> , 2008)
	<i>E. coli</i> <i>Enterococci</i> Outbreak	Concentration	Highest concentration related to a cryptosporidiosis outbreak	(Wohlsen <i>et al.</i> , 2006)
Treated sewage	<i>E. coli</i> <i>Enterococci</i> Outbreak	Concentration	No correlation	(Wohlsen <i>et al.</i> , 2006)
CSO	Fecal coliforms	Event	- No corr. during wet and dry events - No corr. upstream and downstream of CSO	(Gibson III <i>et al.</i> , 1998)
Urban canal and lakes	<i>E. coli</i> <i>Enterococci</i> Fecal coliforms Fecal streptococcus Phage Rainfall (amount)	Concentration	-Moderate to high correlation to the amount of rainfall -Moderate correlation to the rainfall intensity	(Schets <i>et al.</i> , 2008)
Lake	<i>E. coli</i> Total and Fecal coliforms Viruses Turbidity	High concentration	Trigger level has been developed from ICR data set of 10 UFC 100 ml <sup>-1</sup> within the association of high Crypto concentration ( $>0.075$ oocysts L <sup>-1</sup> )	(McGuire <i>et al.</i> , 2002)
River	<i>E. coli</i>	Presence/ Absence	- If <i>E. coli</i> absent, Crypto should be absent too - If <i>E. coli</i> present, not necessarily Crypto (conservative indicator)	(Wilkes <i>et al.</i> , 2009)

Table 6.1: Selected studies associating bacterial, viral and physical indicators to *Cryptosporidium* oocysts in various types of matrixes (suite).

Matrix	Microbial or environmental indicators	Association	Conclusions	References
River	<i>E. coli</i> <i>Enterococci</i> Rainfall (24h) Outbreak	Concentration	No correlation	(Wohlsen <i>et al.</i> , 2006)
River	<i>E. coli</i>	Event peaks in agricultural area	- <i>E. coli</i> peak: June-September - <i>Cryptosporidium</i> peak: Mars-April; August-September	(Isaac-Renton <i>et al.</i> , 2005)
River	Coliforms <i>C. perfringens</i> <i>E. coli</i> Fecal streptococcus Rainfall	Event	The rises of parasites and indicators during heavy rainfall are related to lands uses	(Kistemann <i>et al.</i> , 2002)
River	<i>E. coli</i> Total and Fecal coliforms Viruses Turbidity	High concentration	Trigger level has been developed from US ICR data set of 50 UFC 100 ml <sup>-1</sup> within the association of high Crypto concentration (>0.075 oocysts L <sup>-1</sup> )	(McGuire <i>et al.</i> , 2002)
River	<i>C. perfringens</i> Total and Fecal coliforms	Concentration	- Poorly correlated - High level of indicators suggested high probability to find Crypto	(Payment <i>et al.</i> , 2000)
River	<i>C. perfringens</i> Turbidity Rainfall	Event, Concentration	$r_s > 0.6$ for <i>C. perfringens</i> and turbidity	(Atherholt <i>et al.</i> , 1998)
River	<i>E. coli</i> <i>Enterococci</i> <i>C. perfringens</i>	Survival	Die-off rate: <i>E. coli</i> = <i>Enterococci</i> > <i>Cryptosporidium</i> > <i>C. perfringens</i>	(Medema <i>et al.</i> , 1997)
River	<i>C. perfringens</i> Phages	Concentration	Correlated with <i>C. perfringens</i>	(Payment and Franco, 1993)

Table 6.1: Selected studies associating bacterial, viral and physical indicators to *Cryptosporidium* oocysts in various types of matrixes (suite).

Matrix	Microbial or environmental indicators	Association	Conclusions	References
Estuarine system	<i>Aeromonas</i>	Concentration	Correlated with turbidity and <i>Giardia</i>	(Ferguson <i>et al.</i> , 1996)
	<i>C. perfringens</i>			
Ground water	Fecal coliforms	Presence/ Absence	Correlated with arthropods and diatoms in GWUDI	(Moulton-Hancock <i>et al.</i> , 2000)
	Fecal streptococcus			
Treated potable water	Phage	Outbreak investigations	No correlation with low oocysts concentrations	(Neira-Munoz <i>et al.</i> , 2007)
	Turbidity			
Treated potable water	pH	Removal	- Peak turbidity event correspond to Crypto event - No other pathogens found (n = 600)	(Mac Kenzie <i>et al.</i> , 1994)
	Turbidity			

turbidity by chemically enhanced filtration to grant *Cryptosporidium* removal credits in drinking water treatment plants (USEPA, 2005d).

However, the concentrations of *Cryptosporidium* oocysts are rarely correlated with those of traditional fecal indicators such as *E. coli*, total and fecal coliforms and *Enterococci* (Gibson III *et al.*, 1998; Isaac-Renton *et al.*, 2005; Payment *et al.*, 2000; Payment and Locas, 2010; Wohlsen *et al.*, 2006; WHO, 2009). As a consequence, additional costly specific *Cryptosporidium* monitoring in source water (LTESWTR2) and in treated water (DWI regulation) and treatment requirements (log removal and bin classification) have been regulated (ICR). These requirements are based on an economic analysis of the risk of infection that considers the concentration and fraction of infectious oocysts.

The main objective of this study was to estimate the mass loadings of total and infectious *Cryptosporidium* in urban and rural faecal contamination sources using the improved 3D-CC-IFA method. The secondary objectives were to: (1) quantify the removal of total and infectious oocysts by two full scale wastewater treatment plants using aerated lagoons and sequential bioreactors; (2) investigate the relationships between turbidity and selected microbial indicators and *Cryptosporidium* in the various sources of fecal contamination in urban (raw sewage and wastewater) and rural (dairy cattle) pollutions sources; (3) estimate oocysts concentrations in receiving water bodies using baseline and upper unit mass loadings. Finally, unit mass loading per equivalent person or animal are presented.

## **6.3 Material and Method**

### **6.3.1 Description of the urban WWTP**

Two WWTPs using secondary biological treatment were chosen in the Greater Montreal area (CANADA). Both plants receive combined sewage with minor industrial flows, include primary settling and do not disinfect or add coagulants. WWTP-S is equipped with aerated lagoons (AL) with an annual average hydraulic retention time (HRT) of 16 d. It serves a population of about 63,000 p.e. with an average annual flow of  $47,000 \text{ m}^3 \text{ d}^{-1}$ . During the 2009 sampling campaign (Lalancette *et al.* submitted in 2011, Chapter 5), average flow were noted to be  $44,400 \text{ m}^3 \text{ d}^{-1}$ ,



ranging from 12,100 to 73,100 m<sup>3</sup> d<sup>-1</sup> (April to November). The WWTP-V is equipped with sequential bioreactor (SBR) with an annual average HRT of 7 h. It serves a population of about 30,000 p.e. with an average annual flow of 20,000 m<sup>3</sup> d<sup>-1</sup>.

### 6.3.2 Description of rural sub watershed

A survey was conducted in the watershed of the Ruisseau Au Castor (11.2 km<sup>2</sup>) in Southern Quebec (CANADA). From monitoring completed from 1997 to 2007 at 1 km upstream of our sample point, first percentile, mean and maximum daily discharges were estimated at 26, 16,111 and 783,648 m<sup>3</sup> d<sup>-1</sup>, respectively (MDDEP, 2009). Higher discharge flows were mostly observed in January and April and lowest levels from July to October. During the 2009 sampling period going from June to November (Lalancette *et al.*, submitted in 2011, Chapter 5), flow rates ranged from 29 to 12,774 m<sup>3</sup> d<sup>-1</sup> with an average of 633 m<sup>3</sup> d<sup>-1</sup>. Precipitations were recorded at the closest (17 km north-west) Canadian government weather station (Environment Canada, 2010). During the 2009 campaign, daily precipitation averaged at 3 mm d<sup>-1</sup> with a maximum of 54.2 mm d<sup>-1</sup>. Above 1.1 mm d<sup>-1</sup>, runoff event would most likely occurred (Michaud *et al.*, 2005), corresponding to 50% of our sampling points. The area drained by this small watershed is mainly agricultural (97%) and is predominantly occupied by dairy and grain productions. Landscape is slightly undulated and shows a longitudinal elevation gradient in the Eastern area (Michaud *et al.*, 2005). Underground drainage is used on 52% of the cultivated land, but inlets are also used for surface drainage (Michaud *et al.*, 2005). The Ruisseau au Castor watershed contains 9 dairy farms, 1 pig and 5 crop productions. Each dairy farm is composed of approximately 50 cows, 35 heifers, and 40 cow-heifers. In 2009, a total of 738 dairy cattle have been estimated, including all age-groups. Bovine manure of 7 of the 9 dairy farms is mostly spread to land inside the watershed area, whereas hog manure is generally spread in another area (R. Lauzier from Ministère d'Agriculture, Pêcheries *et* alimentation du Québec, pers. comm.). Most manure is spread in spring and fall, but cattle slurry can be spread after each forage harvest, depending on the climatic conditions.

### 6.3.3 Microbiological and indicator methods

Concentration and isolation of parasites included a combination of grab sampling of wastewater during the early morning flow peak, composite sampling of feces and cartridge filtration for discharge water was used depending on the type of source as described in detail by Lalancette *et al.* (submitted in 2011, Chapter 5). The *Cryptosporidium* Double and Direct Detection on Cell Culture with Immunofluorescent Assay (3D-CC-IFA) protocol was fully described elsewhere (Lalancette *et al.*, 2010) as well as all control experiments and sampling campaign (Lalancette *et al.*, submitted in 2011, Chapter 5). In summary, oocysts were isolated using immunomagnetic separation (IMS) per manufacturer instructions (Dynabeads GC-Combo; Invitrogen, Carlsbad, CA) and pre-treated using an acidified buffer for 1 h at 37°C. Recovered oocysts were washed with infection medium and then seeded on HCT-8 cell monolayers for 72 h incubation. Immunodetection of cell culture foci of infection used a primary antibody (#A600UN, Waterborne, Inc.; 0.24 µL Ab: 150 µL PBS per chamber slide; 1 h incubation at RT) and an anti-rat secondary antibody (#F6258, Sigma-Aldrich; 0.68 µL Ab: 150 µL PBS per chamber slide; 1 h incubation at RT). After these steps had been taken, the oocysts were immunodetected with EasyStain GC combo (BTF) diluted 1/10 in BFT Fixing Buffer. Microscopic counts were performed at a magnification of 400X (600X for samples with high background staining) using an Olympus BX51 microscope (Olympus, Tokyo, Japan) equipped with FITC (U-N51006) and CY3 (U-N4107A) filters. For total *Giardia* counts, the US EPA 1623 method (USEPA, 2005b) was followed. IMS purified cysts were fixed with methanol on Dynal Spot-on slides (IDEXX No. 30201) and then stained with DAPI and EasyStain GC combo (BTF). Microscopic counts at 400X and at 1000X included FITC, DAPI, and differential interference contrast (DIC) observations. Standard methods were used for turbidity (SM No. 2130) using a Hach 2100AN, total suspended solid (TSS SM No. 2540 D), *Enterococci* (membrane filtration on mE Difco No. 233320 method USEPA 1600 u), total coliforms (membrane filtration on mI, Difco No. 2124882, method USEPA 1604), *E. coli* (membrane filtration on mTEC, Difco No. 233410 method USEPA 1604).

### 6.3.4 Ratio and point daily load estimates

Sequential samples of plant raw sewage and of secondary treatment effluent were used to evaluate log removals by wastewater treatment. Ratios of turbidity, microbiological indicators and parasites for data collected concurrently were calculated. Samples below detection limits were removed and p-values were calculated using Excel (Microsoft) software, two-tails and unequal variances Student's t-Test.

### 6.3.5 Mass load models

Probabilistic models were developed to describe the range of total and infectious *Cryptosporidium* daily loadings (Table 6.4) based on the probability distributions of unit production and corresponding effluent ( $Q_e$ ) or discharge stream ( $Q_s$ ) daily flow rates. Since input variables contain method or knowledge uncertainties and heterogeneous population variabilities (Haas *et al.*, 1999), and because of the extreme variability in the reported concentrations of oocysts in cattle (Starkey *et al.*, 2007) and wastewater, baseline (BL) and upper (UP) scenarios were developed. Parameters were then characterized with probability distribution functions (PDF) and served as inputs in Monte Carlo (MC) simulations using Crystall Ball® 11.1 (Oracle®) software (CB). Table 6.4 presents the PDF used for concentrations, recovery, infectivity and dilution flow rates as well as variables definitions and the equations used to calculate loadings.

## 6.4 Results and discussion

### 6.4.1 Turbidity, microbial indicators and *Cryptosporidium* removals in WWTP

Figure 6.1 summarizes the log removal of various physical and microbiological parameters from our 2009 study and reported by Rose *et al.*, (2004). Clear trends are observed with clustered removals of particulate related parameters (turbidity and TSS), indicators and parasites. TSS and

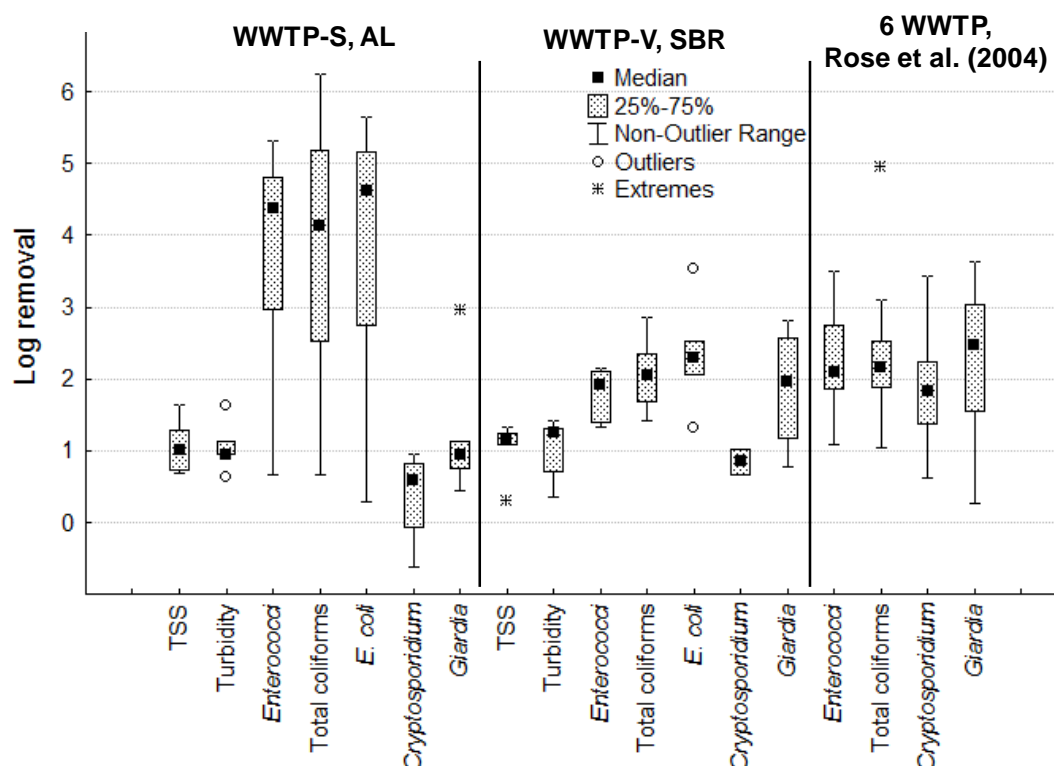


Figure 6.1: Log removal of physical parameters (TSS: total suspended solids and turbidity), microbiological indicators (*Enterococci*, *E. coli* and total coliforms) and pathogenic protozoan (*Cryptosporidium* and *Giardia*) by an aerated lagoons WWTP-S ( $n = 4-13$ ), a sequential bioreactor WWTP-V ( $n = 2-8$ ) and combined data from 6 secondary WWTP of Rose *et al.* (2004) study ( $n = 31-33$ ). Data pairs including values BDL were removed.

turbidity measurements were removed with medians of 1-1.2 log by the two WWTPs and their respective geometric mean effluents concentrations varied from 10 and 18  $\text{mg L}^{-1}$  for TSS and from 7 to 11 NTU for turbidity for plants S and V. Median log removals of fecal indicators in the WWTP-S using lagoons (average HRT 16 d) ranged from 4.4-4.6, while they were limited to 1.9-2.3 in the WWTP-V using SBR with a shorter retention time (average HRT 7 h) coherent with those reported by Rose *et al.*, (2004). As reported by Davies-Collie *et al.*, (1999), marked seasonal differences in indicator mean removals were expected because of the differences in sunlight exposure. For WWTP-S, very modest average removals of 0.7-1.8 log ( $n = 3$ ) were observed during winter corresponding to the period of low light exposure and partial ice cover,

while removals in spring and summer increased between 4.3 and 5.2 log ( $n = 8$ ). When combining the log removal data from our two WWTPs, strong correlations ( $r \geq 0.9$ ) were found between microbial indicators (*E. coli*, total coliforms, *Enterococci*). In WWTP-S, previous findings by Payment *et al.*, (2003) showed average log removal of 3.7 for *E. coli* and *Enterococci*. These findings fall in the range of removals of 1.4 to 3 log observed for secondary treatment in the Rose *et al.* (2004) study investigating 6 WWTPs using activated sludge, nitrification and biological nutrient removal. These adapted values do not include removals observed in downstream additional treatment. Minimal median removals  $<1.5$  log were measured in both plants for *Cryptosporidium* in agreement with previous reports varying from 0.7-2 (Crockett, 2007), 0-2.2 in Rose *et al.* (2004), 0.02–1 (Robertson *et al.*, 2000) and 0.6 (Medema and Schijven, 2001). Mean removals of *Giardia* cysts by the AL (WWTP-S) decreased significantly from 1.5 log in spring and summer to 0.8 log in winter. The overall geometric mean removals of cysts of 0.94 log observed in this plant were quite lower than the value of 1.9 log reported by Payment (2003) using an ICR like method. These findings fall within published ranges of log removals of 1.7-2 (Robertson *et al.*, 2000), 1.2 (Medema and Schijven, 2001) and 1.6–2.7 (Rose *et al.*, 2004). Differences in the reported performances also reflect the reference statistical treatment of data (GM, AM, median), the inclusion of data below detection limits (BDL), the use of aggregate site data as opposed to paired values estimations, the limitations associated with low raw sewage concentrations, and the timing of sampling and the seasonal variations. Both protozoan were less eliminated than microbial indicators and *Cryptosporidium* slightly less than *Giardia* as reported by Robertson *et al.* (2000). Poorer reductions of protozoan were also reported when compared to that of indicators by an activated sludge WW treatment facility (Chauret *et al.*, 1999). The mechanisms responsible for the inactivation and/or the destruction of protozoan by biological treatment process remain to be identified (Fayer and Xiao, 2007).

#### 6.4.2 Temporal variations of concentrations of *Cryptosporidium* and of microbial and environmental indicators in the discharge stream

Table 6.2 summarizes geometric mean, arithmetic mean and standard deviation of TSS, parasites, *E. coli*, *Enterococci*, total coliforms, daily precipitation and the stream flow rates. Temporal variations of concentrations as a function of rainfall and river flows can be seen in Figure 6.2. Only *Enterococci* observations are plotted since it is more resistant than total coliforms and *E. coli* to environmental stress (Liu *et al.*, 2006; Rose *et al.*, 2004). A threshold precipitation value of 1.1 mm d<sup>-1</sup> has been estimated for surface runoff to occur in this watershed (Michaud *et al.*, 2005) and precipitations exceeded this value on 50% of sampling days. In 2009, precipitations averaged 2.3 mm d<sup>-1</sup> and flow rates in the Au Castor River varied widely more than from 29 to 12,773 with an annual average of 1,793 m<sup>3</sup> d<sup>-1</sup>. Values during the sampling days varied 24 fold and correspond to typical values during the period of May to November during which land application of manure is allowed. Peak 24 h precipitation (54 mm d<sup>-1</sup>) on day 210 coincided with the highest *Cryptosporidium* oocysts concentration (15 oocysts L<sup>-1</sup>) in an average flow rate of the stream (125 m<sup>3</sup> d<sup>-1</sup>). Elevated concentrations of *Giardia* cysts and *Enterococci* were not observed on that day. Parasites were not detected during the late summer and fall period on days 266, 280 and 309 for *Giardia* and on day 266 only for *Cryptosporidium* although detection limits varied from 0.02-0.24 (oo)cysts L<sup>-1</sup>. These results clearly show the significant loadings associated with the 738 dairy animals in the watershed. Higher prevalence of *Cryptosporidium* was previously noted in agricultural streams on days with heavy rain (as defined by a ratio of 5:1) (Sischo *et al.*, 2000).

In our study, no significant correlations were observed between any of the indicators and the concentrations of *Cryptosporidium* in either our urban and rural sources. Several studies have failed to establish correlations between parasites and bacterial indicators (Dechesne *et al.*, 2006; Isaac-Renton *et al.*, 2005; Kistemann *et al.*, 2002; Nieminski *et al.*, 2010; Wilkes *et al.*, 2009) although some site specific relationships have been established between *E. coli* and *Enterococci* and total coliforms (Wilkes *et al.*, 2009).

Table 6.2: Parasites, microbial and environmental parameters in raw sewage and WWTP effluents and rural discharge stream (GM: geometric mean, AR: arithmetic average, SD: standard deviation).

	WWTP Effluent				Rural Stream Discharge			
	n	GM	AM	SD	n	GM	AM	SD
TSS (mg/L)	16	1.13E+01	1.55E+01	2.07E+01	10	1.94E+01	4.23E+01	7.31E+01
<i>E. coli</i> (UFC/100mL)	14	1.44E+03	2.59E+04	5.37E+04	8	2.74E+02	3.66E+02	2.62E+02
<i>Enterococci</i> (UFC/100mL)	16	6.14E+02	9.06E+03	1.68E+04	9	6.60E+02	1.59E+03	3.04E+03
Total Coliforms (UFC/100mL)	13	1.02E+04	9.89E+04	1.17E+05	10	1.26E+03	4.44E+03	7.17E+03
<i>Cryptosporidium</i> (oocysts/L)	9	2.03E+01	4.08E+01	3.50E+01	9	1.62E+00	3.06E+00	4.61E+00
<i>Giardia</i> (kysts/L)	10	2.71E+01	1.20E+02	1.82E+02	6	5.89E-01	6.72E-01	3.24E-01
Flow (m <sup>3</sup> /d)	244*	44,000*	44,000*	8,500*	183**	466**	633**	1412**

\* Flow rates from WWTP-S

\*\* Stream discharge flow rates during sampling period

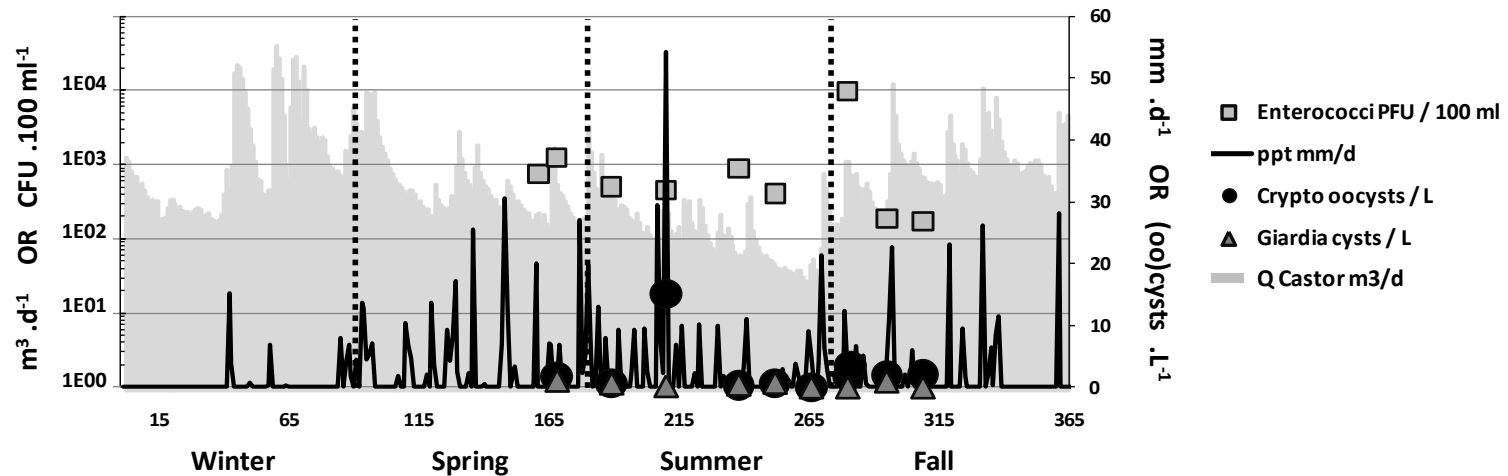


Figure 6.2: Concentrations of *Cryptosporidium* oocysts, *Giardia* cysts and *Enterococci* with daily precipitation and the Castor discharge daily stream flow rate for year 2009. ((Oo)cysts data were corrected for recoveries measured on every sample).

As *E. coli* is the preferred indicator of faecal contamination (Dufour *et al.*, 2003; Unfiltered Systems Working Group Comments on LT2SWTR, 2004; WHO, 2003), ratios of *E. coli* to *Enterococci*, total coliforms, parasites and TSS are presented in Table 6.3 from our 2009 study. Observed values of ratios show significant differences (p-value <0.0001) between urban sources contaminated mainly by sewage (2.24) and rural sources dominated by cattle (0.49). The ratio of *E. coli*/*Enterococci* was previously suggested by others as a source tracking tool (Feachem, 1975; Geldreich, 1966) with ratios of >4 indicative of human and of <0.7 for animal sources (Gannon and Busse, 1989). A ratio of 1.59 from geometric averages of *E. coli*/*Enterococci* in WWTP effluent can be derived from Payment *et al.* (2003). A lower ratio of 0.88 from median of *E. coli*/*Enterococci* reported by Wilkes *et al.* (2009) farmland watershed study. However, the use of these ratios for fecal source tracking has been questioned (Ashbolt *et al.*, 2001; USEPA, 2005c) because of the differential survival rates of *Enterococci* in surface water (Lemarchand and Lebaron, 2003; Liu *et al.*, 2006). Another important source of variability in these ratios is the transport mechanism involved. In an Australian study, the detailed analysis of 5 rain fall events suggests that the pool of *E. coli* from farmland is quasi unlimited, while *Enterococci* was transported mainly during first flush of the events (Cinque and Jayasuriya, 2010). Using published concentrations of *Giardia*/*Cryptosporidium*, estimated mean ratios varied from 1.2-2.3 in 72 urban wastewater effluents (Robertson *et al.*, 2006) and from 0.68-5.5 rural discharge (Isaac-Renton *et al.*, 2005; Ong *et al.*, 1999). The *Giardia*/*Cryptosporidium* mean ratios varied from  $2.5 \pm 2.7$  in sewage down to  $0.78 \pm 0.5$  at the rural watershed discharge. The higher ratios observed in urban sources studied may reflect the varying epidemiology of these parasites and the decreasing prevalence of *Cryptosporidium* in North American wastewater in recent years. Figure 6.3 also shows a clearer relationship ( $r^2 = 0.63$ ) with 5 d rainfall that increases of from 4.3 to 6.6 log at the outlet. Weaker correlations for *Enterococci* loadings and no correlation were observed for *E. coli* and *Giardia* loadings. These observations suggest that oocyst loadings increase steadily with 5 d precipitation but that extreme concentrations observed in this study and reported previously may reflect low dilution in the receiving stream or the exhaustion of the pool of oocysts rather than peak events of transport to the stream. Indeed, although overall 9% of rural stream samples were positive for *Cryptosporidium*, the prevalence, linked to the concentration, was inversely correlated with 5 d cumulative precipitation (Sischo *et al.*, 2000).



Table 6.3: Parasites, microbial and environmental ratio of indicators and parasites in urban (2 WWTP effluents) and rural stream discharge (GM: geometric mean, AR: arithmetic average, SD: standard deviation).

	WWTP Effluent				Rural Stream Discharge				p-value
	n	GM	AM	SD	n	GM	AM	SD	
<i>E. coli</i> / <i>Enterococcus</i>	14	1.62	2.23	1.26	8	0.39	0.55	0.40	<b>0.00</b>
<i>E. coli</i> / Total Coliforms	13	0.19	0.47	0.52	8	0.14	0.42	0.61	0.86
<i>E. coli</i> / <i>Giardia</i>	9	706	9632	13801	5	4965	9586	11716	0.99
<i>E. coli</i> / <i>Cryptosporidium</i>	8	647	4416	7617	8	16	26	23	<b>0.15</b>
<i>E. coli</i> / TSS	14	1181	16181	35767	8	139	332	326	<b>0.12</b>
<i>Giardia</i> / <i>Cryptosporidium</i>	6	0.94	2.46	2.74	6	0.43	0.78	0.50	0.20

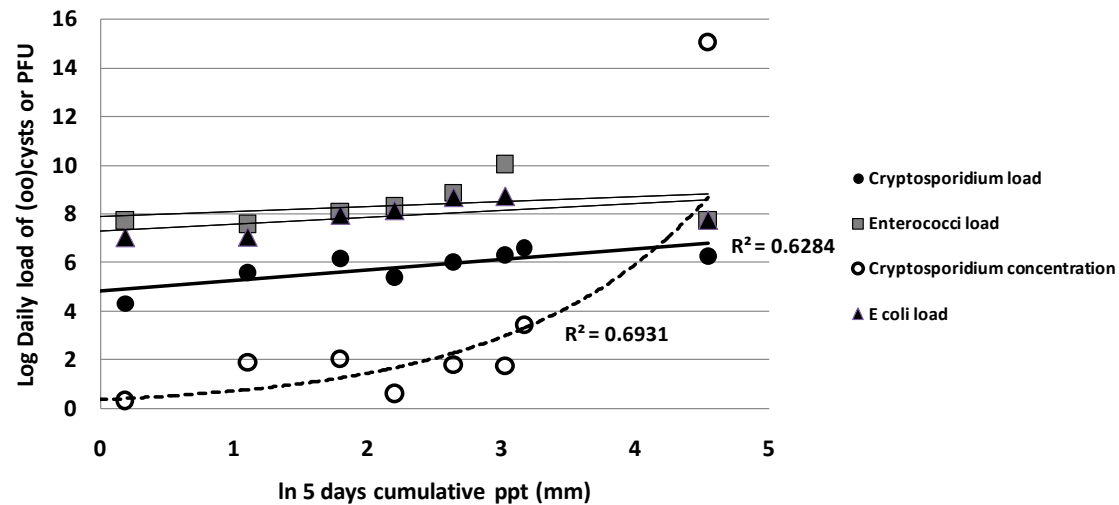


Figure 6.3: Relationship between daily loads and concentrations of *Cryptosporidium* oocysts and load of *E. coli*, *Enterococci* ( $r^2 = 0.33$ ) and 5 days cumulative precipitations. Daily loads are the results of measured concentration multiplied by daily discharge stream flow.

A plausible hypothesis put forward is that farmers are not allowed to spread manure on rainy days and that the pool of accumulated oocysts in soil is depleted by cumulative rain (Sischo *et al.*, 2000). Results of loadings clearly show that peak cumulative events coincide with periods of maximum loads. Indeed, Kistemann *et al.* (2002) estimated that a single 12 h runoff event may contribute to 3-4% of the annual load of *Cryptosporidium*. River concentrations of *Enterococci* were associated with the first flush of runoff events, while, in contrast, *E. coli* river concentrations persisted during the whole event suggesting an unlimited supply (Cinque and Jayasuriya, 2010).

### **6.4.3 Load modelling may be an improvement leading to person/animal equivalents**

In light of the limited use of indicators and the economical burden of comprehensive *Cryptosporidium* surveys, simplified load models predicting the concentrations of oocysts in impacted surface water may represent a useful tool. Daily mass models per person or animal equivalent have been estimated (Table 6.4). Two models were developed for urban and rural contamination sources. For each model, two scenarios of oocysts production were considered: a baseline (BL) and an upper (UP) scenario to take into account reported levels of *Cryptosporidium* concentrations in various fecal sources. Total and infectious oocysts loads were forecasted to highlight the impact of considering the infectious fraction in the estimation of the infection risk. Infectivity environmental estimates specific to each site were used. Since no environmental die-off was accounted for (King and Monis, 2007), resulting risk estimated should be considered as conservative for downstream drinking water plants.

### **6.4.4 Urban model: WWTP effluent contribution to oocysts loadings to surface water**

Figure 6.4 presents the total and infectious oocysts concentration PDFs resulting from the application of baseline and upper concentration distribution scenarios of oocysts in treated WWTP effluents and reported as person-equivalent. The BL concentration scenario regroups data from two surveys from 8 WWTP secondary effluents before disinfection or tertiary treatment, while the UP data from Robertson *et al.*, (2006) representing the highest published

Table 6.4: Urban (a) and rural (b) models variable description, distributions and sources/references with (c) rural and urban model loading equations.

**a) Urban WWTP effluent loads**

Variable	Description	Distribution	Source/Reference
$C_{\text{oocysts, BL}}$ (oocysts $\text{L}^{-1}$ )	Secondary effluent baseline concentration	Weibull (0.1; 1.44; 0.46); range: 0.1-39; Fitted with KS: 0.08; Multiplied by Yes/No (0.73)	(Lalancette <i>et al.</i> , 2010; Rose <i>et al.</i> , 2004)
$C_{\text{oocysts, UP}}$ (oocysts $\text{L}^{-1}$ )	Secondary effluent upper concentration	LogN (1 316; 6 675); range: 100-44 500; Multiplied by Yes/No (0.61)	(Robertson <i>et al.</i> , 2006)
$R_{\text{WW}}$ (%)	Effluent recovery	LogN (53, 19); range: 1-100	(McCuin and Clancy, 2005)
$I_{\text{WW}}$ (%)	Effluent infectivity	Custom with BDL = 0	Lalancette submitted 2011 AEM Chapter 5
$Q_e$ ( $\text{m}^3 \text{d}^{-1}$ )	WWTP-S daily flow	Logistic (43 989; 4 306); range: 12 113-73 114; Fitted with KS: 0.07	WWTP-S monitoring
$p$	Population served by WWTP	Point estimate: 63 000	WWTP-S monitoring
$L_{\text{d, pers, total, BL}}$	Person equivalent baseline total daily load	Model output	
$L_{\text{d, pers, total, UP}}$	Person equivalent upper total daily load	Model output	
$L_{\text{d, pers, inf, BL}}$	Person equivalent baseline infectious daily load	Model output	
$L_{\text{d, pers, inf, UP}}$	Person equivalent upper infectious daily load	Model output	

**b) Rural animal and stream discharge loads**

Variable	Description	Distribution	Source/Reference
$C_{\text{oocysts, calf, BL}}$ (oocysts $\text{g}^{-1}$ )	Fresh calf feces baseline concentration	Custom with BDL = 0	Lalancette submitted 2011 AEM Chapter 5
$C_{\text{oocysts, cow, BL}}$ (oocysts $\text{g}^{-1}$ )	Fresh cow feces baseline concentration	Custom with BDL = 0	Lalancette submitted 2011 AEM Chapter 5
$C_{\text{oocysts, calf, UP}}$ (oocysts $\text{g}^{-1}$ )	Fresh calf feces upper concentration	Gamma (0.4856; 383 745); range: 0-infinity	(Starkey <i>et al.</i> , 2007)
$C_{\text{oocysts, cow, UP}}$ (oocysts $\text{g}^{-1}$ )	Fresh cow feces upper concentration	LogN (36.0; 28.2); range: 0-infinity	(Starkey <i>et al.</i> , 2007)
$R_{\text{feces}}$ (%)	Recovery from feces	LogN (21.1; 11.2); range: 1-100	Lalancette submitted 2011 AEM Chapter 5
$I_{\text{calf}}$ (%)	Calf oocysts infectivity	Custom with BDL = 0	Lalancette submitted 2011 AEM Chapter 5
$I_{\text{cow}}$ (%)	Cow oocysts infectivity	Custom with BDL = 0	Lalancette submitted 2011 AEM Chapter 5
$W_{\text{calf}}$ (kg)	Calf (< 6 months) weight	Betapert (22.9; 108.2; 218.2)	Adapted from (Starkey <i>et al.</i> , 2007) and local data

Table 6.4: Urban (a) and rural (b) models variable description, distributions and sources/references with (c) rural and urban model loading equations (suite).

$W_{\text{young heifer}}$ (kg)	Young heifer (6-12 months) weight	Uniform (121; 306)	Adapted from (Starkey <i>et al.</i> , 2007) and local data
$W_{\text{old heifer}}$ (kg)	Old heifer (12-24 months) weight	Uniform (306; 702)	Adapted from (Starkey <i>et al.</i> , 2007) and local data
$W_{\text{cow}}$ (kg)	Cow (>24 months) weight	N (650; 50); range : $\pm 2$ St.-Dev.	Adapted from (Starkey <i>et al.</i> , 2007) and local data
$N_{\text{calf.farm}}$ (per farm)	Calf (< 6 months)	N (32; 25); range 1-2 St.-Dev.; multiplied by Yes/No (0.5)	Local data
$N_{\text{young heifer.farm}}$ (per farm)	Young heifer (6-12 months)	N (32; 25); range $\pm 2$ St.-Dev.; multiplied by Yes/No (0.5)	Local data
$N_{\text{old heifer.farm}}$ (animal farm <sup>-1</sup> )	Old heifer (12-24 months)	N (35; 21); range 1-2 St.-Dev.	Local data
$N_{\text{cow.farm}}$ (animal farm <sup>-1</sup> )	Cow (>24 months)	N (55; 14); range $\pm 2$ St.-Dev.	Local data
$E_{\text{d.animal}}$ (kg <sub>feces</sub> kg <sub>animal</sub> <sup>-1</sup> d <sup>-1</sup> )	Excretion rate	N (0.0326; 0.01); 0-infinity	(Wilkerson <i>et al.</i> , 1997)
$n_{\text{oocysts.BL}}$ (counts)	Baseline oocyst counts in stream discharge	Custom with BDL = 0	Lalancette submitted 2011 AEM Chapter 5
$V$ (L)	Baseline sample volume in discharge	Uniform (4-47)	Lalancette submitted 2011 AEM Chapter 5
$R_s$ (%)	Stream discharge recovery	LogN (24; 11); range: 1-100	Lalancette submitted 2011 AEM Chapter 5
$Q_s$ (m <sup>3</sup> d <sup>-1</sup> )	Stream discharge flow	LogN (645; 1636); range: 29-633	Local data
$F$ (farm WS <sup>-1</sup> )	Amount of farm spreading cattle manure in watershed (WS)	Point estimate	Local data
$L_{\text{d.total.BL}}$	Dairy cattle equivalent baseline total daily load	Model output	
$L_{\text{d.total.UP}}$	Dairy cattle equivalent upper total daily load	Model output	
$L_{\text{d.inf.BL}}$	Dairy cattle equivalent baseline infectious daily load	Model output	
$L_{\text{d.inf.UP}}$	Dairy cattle equivalent upper infectious daily load	Model output	

Table 6.4: Urban (a) and rural (b) models variable description, distributions and sources/references with (c) rural and urban model loading equations (suite).

$L_{d,animal,total,BL}$	Stream baseline total daily load per dairy cattle equivalent	Model output
$L_{d,animal,total,UP}$	Stream upper total daily load per dairy cattle equivalent	Model output
Apparent log removal	Environmental and management removal of oocysts from fresh feces to stream discharge estimated from baseline local data	Model output

c) Equation used in loading rural and urban models

Equation 1	Person equiv. $L_{d,total,BL \text{ or } UP} = (C_{oocysts,BL \text{ or } UP} \times R_{nw} \times Q_{nw}) \times p^{-1}$
Equation 2	Person equiv. $L_{d,inf,BL \text{ or } UP} = (C_{oocysts,BL \text{ or } UP} \times R_{nw} \times I \times Q_{nw}) \times p^{-1}$
Equation 3	Dairy cattle equiv. $L_{d,total,BL \text{ or } UP}$ $= ([C_{oocysts,calf,BL \text{ or } UP} \times R_{calf} \times W_{calf} \times N_{calf,farm}]$ $+ [C_{oocysts,cow,BL \text{ or } UP} \times R_{cow} \times (W_{young\ heifer} \times N_{young\ heifer,farm} + W_{old\ heifer} \times N_{old\ heifer,farm} + W_{cow} \times N_{cow,farm})])$ $\times E_{d,animal} \times F$
Equation 4	Dairy cattle equiv. $L_{d,inf,BL \text{ or } UP}$ $= ([C_{oocysts,calf,BL \text{ or } UP} \times R_{calf} \times W_{calf} \times N_{calf,farm} \times I_{calf}]$ $+ [C_{oocysts,cow,BL \text{ or } UP} \times R_{cow}$ $\times I_{cow} (W_{young\ heifer} \times N_{young\ heifer,farm} + W_{old\ heifer} \times N_{old\ heifer,farm} + W_{cow} \times N_{cow,farm})]) \times E_{d,animal} \times F$
Equation 5	Stream $L_{d,total,BL \text{ or } UP} = n_{oocysts} \times V^{-1} \times R_s \times Q_s$
Equation 6	Apparent log Rural Removal = $-\log_{10} \left[ \frac{\text{Stream } L_{d,total,BL}}{\text{Dairy cattle equiv. } L_{d,total,BL}} \right]$

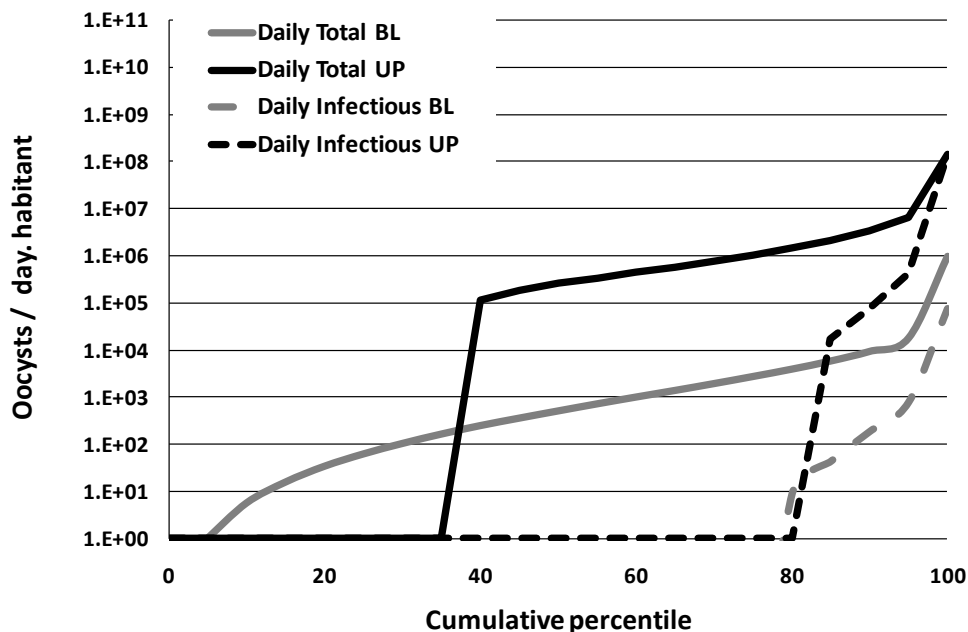
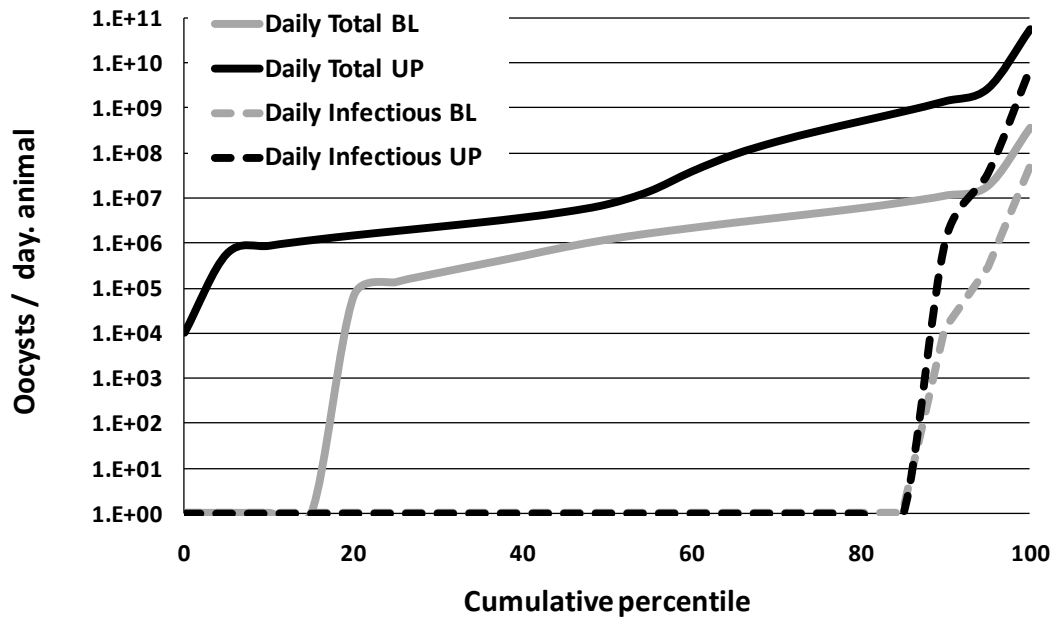


Figure 6.4: Probability distributions of total and infectious *Cryptosporidium* using baseline (BL) and upper (UP) scenario loads from WWTP-S discharge.

*Cryptosporidium* concentrations measured in a developed country in Norwegian WWTPs (Table 6.5). Median estimates of total counts of oocysts  $\text{pers}^{-1} \text{d}^{-1}$  vary 510 fold from BL ( $5.1 \times 10^{+2}$ ) to UP scenario ( $2.6 \times 10^{+5}$ ), while average and 90<sup>th</sup> centile values vary by more orders than 2.5 orders of magnitude. Similar major shifts in concentration are noted between infectious and total oocysts with estimates varying with factors of 226-405 folds between the BL and UP scenarios. Significant but more modest differences (43-49 times) are noted between the estimates of 90<sup>th</sup> percentile of total and infectious oocysts, showing the importance of accounting for the infectious fraction. Estimates of oocysts concentrations at low percentiles depend on the distribution of data, especially the proportion of samples BDL. The UP scenario data for total oocysts from Robertson and al., (2006) was generated with grab sampling and method 1623 using low sample volume (5 times 2 mL). It offers a relatively high DL of about 100 oocysts  $\text{L}^{-1}$  as compared to the DLs of local study ranging from 0.33-2 oocysts  $\text{L}^{-1}$ . The impact of the limit of detection is also clearly shown with the PDFs of the infectious oocysts for which no estimates can be computed before the 85<sup>th</sup> centiles because of values of DLs. High DL hinders the calculation of lower centiles and influences the mean estimates of concentrations, but it does not preclude the estimation of higher centiles values for risk analysis. Using the most conservative total loads estimates at the 95<sup>th</sup>

a)



b)

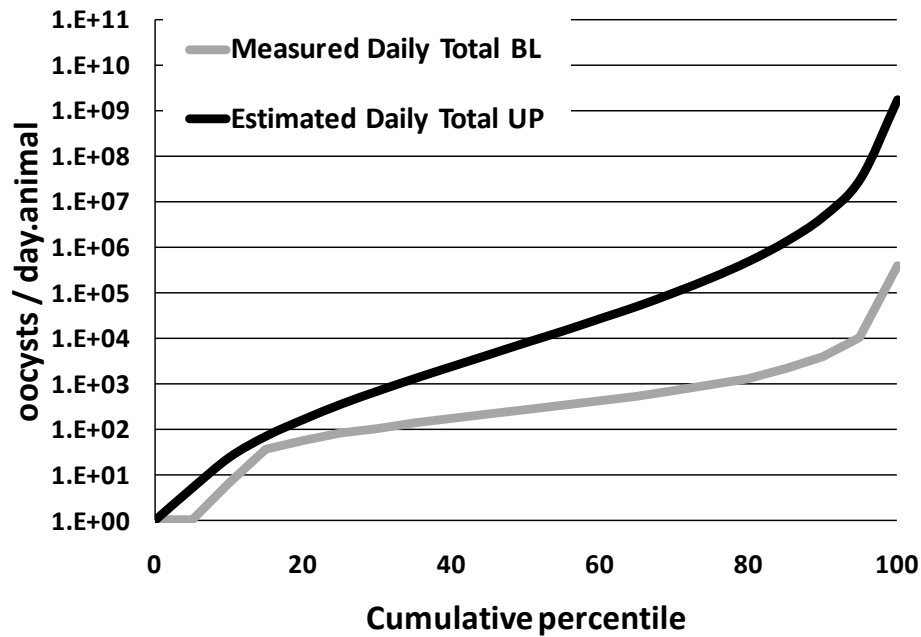


Figure 6.5: Probability distribution of total and infectious oocysts daily produced by animal equivalent using baseline and upper production scenarios in a) animals and b) stream discharge.

centile will inflate the risk estimates, as they represent extreme loadings per capita as high as  $10^{+6}$  oocysts  $\text{pers}^{-1} \text{d}^{-1}$  that could occur in rare events. Maximum reported excretion of oocysts in patients with clinical cryptosporidiosis are scarce but values ranging from  $2.5 \times 10^{+5}$  to  $7.4 \times 10^{+8}$  oocysts  $\text{d}^{-1}$ , and from  $3.1 \times 10^{+3}$  to  $5.7 \times 10^{+5}$  oocysts  $\text{d}^{-1}$  for patients with mild or no symptoms have been reported during clinical trials (Chappell *et al.*, 1999). Given the documented removals by WWTP presented in Figure 6.1, the stochastic estimates appear realistic and credible.

Interestingly, the trends for BL and UP scenarios are similar for total and infectious oocysts loads, although estimates can only be generated at much higher centiles for infectious loads. Infectious loads reflect both the presence of human infectious species in wastewater and their survival through the collection system and WWTP. Species previously reported in sewage may be pathogenic to humans (*C. parvum* and *C. hominis*) or not (*C. baileyi*, *C. snake* and opossums genotypes) (Xiao and Ryan, 2004) and other animal sources (squirrel, rats, racoon, cats, dogs, birds, etc.) of oocysts have been isolated in combined and mixed sewers. Removals of oocysts in wastewater secondary treatments are usually low (Crockett, 2007; Medema and Schijven, 2001; Robertson *et al.*, 2000; Rose *et al.*, 2004), which is reflected by the high prevalence and wide range of concentrations of oocysts in effluents. UP scenario values from Norwegian plants may be indicative of high prevalence, but since cryptosporidiosis is not a reportable disease, it is seldom diagnosed. However, giardiasis is reported for about cases are 8.5 cases per 100,000 persons (Robertson *et al.*, 2006), which is about 10 times lower than 2009 reported giardiasis cases in WWTP-S municipalities (90 cases per 63 000 persons in 2009, pers. comm. Ministère de la Santé et des Services Sociaux du Québec).



## 6.4.5 Rural model: watershed discharge from dairy cattle farms watershed contribution to oocysts load in surface water

### 6.4.5.1 Animal model

The BL scenarios were established from our 2009 surveys totalizing 20 calf and 21 cow fresh feces samples (Table 6.4, Figure 6.5). For total counts, median and average estimates ranged 1 to  $4 \times 10^{+6}$  oocysts animal<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup>. Total and infectious oocysts loads were below the model threshold the first 20<sup>th</sup> and 90<sup>th</sup> percentiles and both ranged from about  $10^{+4}$  to  $10^{+8}$  oocysts animal<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup>. At the 90<sup>th</sup> percentile, a large difference (3,0 log) is noted between total and infectious loadings (Figure 6.5). The UP scenarios data was extracted from the Starkey *et al.* (2007) model, showing the highest *Cryptosporidium* concentration reported (Table 6.4, Figure 6.5). Median and average values of total counts were estimated to reach  $7 \times 10^{+6}$  and  $2 \times 10^{+10}$  oocysts animal<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup>, a large difference of 3.5 log. Total oocysts loads were significant from low centiles reflecting the high prevalence in composite samples. In contrast, infectious oocysts loads were below the model threshold at the 90<sup>th</sup> centiles and ranged from  $10^{+4}$  to  $10^{+11}$ . At the 90<sup>th</sup> percentile, about 3 log differed from total and infectious (Figure 6.5). These loads per animal equivalent are coherent with previous reports considering the high concentrations of oocysts ( $10^{+7}$  oocysts g<sup>-1</sup>) previously reported in calf feces (Fayer *et al.*, 1998; Starkey *et al.*, 2005). Data is lacking for concentration of oocysts in adult cattle feces. Early stochastic modeling of rural pathogen contamination sources produced the first PDFs of daily production of total oocysts and of *Campylobacter spp.* based on animal allowing the mapping of areas of most concern (Dorner *et al.*, 2004). Mean daily total oocysts production were estimated at  $3 \times 10^{+7}$  oocysts d<sup>-1</sup> cattle<sup>-1</sup> and  $1 \times 10^{+8}$  oocysts d<sup>-1</sup> calf<sup>-1</sup> (Dorner *et al.*, 2004), slightly higher than our measured mean daily production ( $4 \times 10^{+6}$ ). This study provides the first PDFs of total oocysts production of cows and of infectious oocysts based on field measurements. Difference between total and infectious oocysts measured directly in fresh feces most probably reflects the presence of species non infectious to human such as *C. andersoni* in adult cattle (Santin *et al.*, 2004), knowing that *C. parvum* infect mostly young calf (Fayer and Xiao, 2007).

#### 6.4.5.2 Environmental removals

Environmental removals were estimated from the unpaired differences between PDFs of baseline total loadings of oocysts production and loadings from concentrations in the stream discharge during the manure land application period. The resulting removal distribution (mean of 3.4 log) ranged widely from the 10<sup>th</sup> (1.2 log) to the 90<sup>th</sup> centiles (5.5 log). Data included in the model is comprised of days with (50%) and without (50%) run-off. The Ruisseau au Castor subwatershed is locally renowned for its good agricultural practice, namely the presence of riparian strips and manure application on non rainy days (Michaud *et al.*, 2005). The quantification of pathogen retention by riparian strips has been quantified at lab scale (Atwill *et al.*, 2002; Atwill *et al.*, 2006b; Tate *et al.*, 2004). Atwill *et al.* (2002) measured from 1 to 3.9 log of removal by a 3 m wide strip, depending of the soil density and its slope (5-20%). In 2004, Tate *et al.* showed that 43.6% of the oocysts mass loadings originate from subsurface transport when the slope is below 5%. Predicting microbial transport in a watershed is not an easy task as it depends of soil conditions, local topography and precipitation. Several mechanistic models have been developed to develop such predictions (Ferguson, 2005; Haydon, 2006). Calibration of transport parameters are based on lab or pilot scale experimentation (Ferguson *et al.*, 2010) that can be then extrapolated to watersheds (Cinque and Jayasuriya, 2010). The use of the simplified stochastic model proposed provides global loadings that include oocyst production and storage, account for manure management, elimination, land application and transport as well as oocysts attenuation in soil and water.

#### 6.4.5.3 Watershed discharge loadings

Measured oocysts loadings at the stream discharge were modeled (BL scenario), while upper scenario loadings at discharge were deducted using animal daily total UP oocysts production and observed environmental removals as described in Table 6.4. For total counts, median and average concentrations were estimated to  $3 \times 10^{+2}$  and  $2 \times 10^{+2}$  oocysts animal<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup>, for a difference of 0.9 log. BL total oocysts loadings ranged from about  $10^{+1}$  to  $10^{+6}$  oocysts animal<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup> (Figure 6.5). Using UP scenario extracted data from Starkey *et al.* (2007), total oocysts loadings ranged

from  $10^{+1}$  to  $10^{+9}$  oocysts animal<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup>, while median, average and 90<sup>th</sup> centile values differed considerably (4 log). No infectious oocysts were detected at the discharge precluding the estimation of infectious loadings. The likelihood of detecting infectious oocysts at the discharge point is very low considering the scarcity of positive samples in animal samples and the environmental removal and die-off. Moreover, the non human pathogenic *C. andersoni* has been shown to be the most frequently identified species in a rural surface water (Ruecker *et al.*, 2007).

#### **6.4.5.4 Interpreting the distribution of loadings to predict *Cryptosporidium* concentrations in receiving water sources**

The determination of an incremental risk of infection of  $10^{-4}$  per year calls for the determination of the reference centile at which this level of risk must be met. Most often, the average risk is used to estimate compliance to this reference level (McGuire *et al.*, 2002; WHO, 2009). The development of probability functions of loads and diluted concentrations offer a strong basis for the estimation of the distribution of the risk of infection. Of utmost importance is the determination of risk levels during special events that lead to peak concentrations at the water intake and constitute maximum infectious risks. According to our load models, large differences are noted between medians and average loads (4 log), supporting the use of average loadings. The use of a 90<sup>th</sup> percentile value could be considered as a conservative value that could be representative of peak events of contamination. More importantly, taking into account the infectious fraction will decrease 90<sup>th</sup> values of loads by 0.8 to 1.5 log in sewage effluent and by 3 log in animal excretion. The difference in load correction brought by the infectious fraction highlights the differential attenuation in the agricultural environment and from WWTP treatment. In order to formulate better treatment strategies, this difference must be taken into account. Most risk analysis done for *Cryptosporidium* use total counts and correct for a percentage of infectivity based on an indirect evaluation of the distribution of infectious oocysts. The risk assessment completed by the USEPA (USEPA, 2005a) considers two probability approaches to estimate the most likely proportion of infectious oocysts: (1) a triangular distribution with a mode of 20% (Lower bound LB: 15%; Upper Bound UB: 25%) describing the proportion of oocysts containing identifiable physical structures using DIC and DAPI methods; (2) a triangular distribution (mode

40%, LB 30%, UB 50%) from a study where samples were analyzed with both methods 1623 and a CC-PCR test for infectivity (LeChevallier *et al.*, 2003).

## 6.5 Conclusion

Neither concentrations or removal of microbial indicators and turbidity are correlated with those of *Cryptosporidium* oocysts as shown by observations from 8 WWTPs and field data of rural stream discharge of a subwatershed with cattle manure land application. Relative abundance and prevalence of *Giardia* kysts and *Cryptosporidium* oocysts varies significantly in raw sewage, treated wastewater, animal feces and rural stream discharges, with a greater prevalence of *Cryptosporidium* in rural sources and *Giardia* in urban sources. Environmental loadings provide a better basis to understand and quantify the impact of rainfall on the transport and removal of oocysts of *Cryptosporidium* in a rural watershed. Probability distributions of animal/human equivalent total oocysts production show that loadings follow the same trends and may vary over seven orders of magnitude. However, distributions of infectious loadings show marked differences with smaller fractions of human infectious oocysts in fresh dairy feces when compared to treated wastewater. These findings suggest that the reduction of public health risk from infectious oocysts should target the implementation of improved wastewater treatment processes such as UV disinfection or membranes in urban sources.

## 6.6 Acknowledgments

This study was supported by the NSERC Industrial Chair on Drinking Water at the École Polytechnique of Montréal, which is jointly funded by the City of Montréal, John-Meunier/Veolia Water, the City of Laval, and the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada.

## CHAPITRE 7. SYNTHÈSE ET DISCUSSION

### 7.1 Quantification de la fraction infectieuse des oocystes: Développement, Optimisation et Validation de la 3D-CC-IFA

Dans l'optique d'améliorer les outils méthodologiques disponibles pour la compréhension du risque que posent les oocystes de *Cryptosporidium*, la nouvelle méthode 3D-CC-IFA permet une détection directe de la fraction infectieuse par le biais de comptes d'oocystes et de foyers infectieux dans un même échantillon (Figure 4.2). Cette méthode résulte de l'intégration de deux techniques d'immunodétection spécifiques à l'étape de détection (Figure 4.10), d'une simplification et optimisation des milieux et conditions de prétraitement et d'infection qui respectent l'essentiel des conditions physiologiques critiques (Figure 4.3, 4.4, 4.5). La validation de cette technique pour l'analyse d'échantillons environnementaux (Figure 4.8) montre qu'elle représente un outil avantageux mieux adapté à l'estimation de la fraction infectieuse (Table 3.2).

De manière générale, les méthodes d'infectivité utilisant l'inoculation d'oocystes sur des cellules en culture permettent de remplacer les complexes et coûteuses méthodes *in vivo*. Différentes variantes des méthodes infectant des cellules en culture ont été validées par des essais faits sur des souris. En effet, les résultats obtenus par CC-FDM-MPN et d'infection des souris avec *C. parvum* sont équivalents pour un traitement à lumière UV pulsée à large spectre (Slifko *et al.*, 1999). Dans une seconde étude, l'infectivité de 5 géotypes de *C. parvum* a été estimée avec les méthodes de CC-RT-PCR et d'inoculation de souris. Les doses moyennes infectieuses estimées à partir des cellules HCT-8 et à partir d'essais animaux ont montré une bonne corrélation ( $r = 0.85$ ), démontrant que les méthodes *in vitro* sont d'excellents standards d'infectivité (Rochelle *et al.*, 2002). De plus, les espèces infectieuses capables de produire des foyers suite aux étapes de stimulation et d'infection sur des cellules en culture sont des espèces pathogéniques pour l'humain *C. parvum*, *C. hominis* et *C. meleagridis* (Johnson *et al.*, 2005; Johnson *et al.*, 2010).

Les comptes obtenus par les méthodes en culture cellulaire peuvent aussi servir à préciser les doses utilisées dans les modèles d'analyses de risque. En effet, certains auteurs ont utilisé directement les concentrations d'oocystes infectieux dans les modèles de risque (Aboytes *et al.*, 2004; LeChevallier and Au, 2004), contrairement à d'autres qui corrigent des comptes totaux à

l'aide d'un pourcentage d'infectivité arbitrairement établi comme ayant, par exemple, un mode de 40% (USEPA, 2005a). De plus, les modèles de dose-réponse utilisés en analyse de risque ont été développés à l'aide de souches fraîches d'espèces infectieuses pour l'humain (Chappell *et al.*, 2006; DuPont *et al.*, 1995; Okhuysen *et al.*, 1999) ce qui n'est pas représentatif de la spéciation et de l'état des oocystes dans l'environnement.

L'avantage additionnel de la méthode 3D-CC-IFA développée par les présents travaux est d'obtenir le dénombrement total et la fraction infectieuse directement sur le même échantillon. Tel que décrit dans la section 4.5.7, les bénéfices de ce calcul direct est que les deux comptes possèdent le même biais méthodologique. Lors de division d'échantillon ou de prise de deux échantillons indépendants, les pertes d'oocystes inégales engendrées par les deux méthodes en plus de leur hétérogénéité environnementale initiale peuvent être considérables. Aussi, la combinaison des deux détections diminue la durée et les coûts d'analyse tout en offrant des taux de récupérations équivalents à ceux retrouvés dans la méthode de compte total standardisée (Figure 4.7).

L'autre apport positif de travaux de développement de la 3D-CC-IFA concerne l'optimisation de ses milieux de stimulation et d'infection. Les travaux ont été menés en posant un critère d'évaluation, soit la capacité d'un supplément physiologique à inciter un oocyste à former un foyer infectieux et donc, d'engendrer un plus grand nombre de foyers qu'une autre condition. D'autres critères de performances avaient été utilisées tels que les comptes de phases de vie (Gold *et al.*, 2001; Upton *et al.*, 1995; Wu *et al.*, 2009) ou la présence d'ADN (Aboytes *et al.*, 2004; Di Giovanni *et al.*, 1999; LeChevallier *et al.*, 2003). Le critère utilisé dans les présents travaux permettrait ainsi de mieux évaluer les conditions optimales aux calculs des fractions infectieuses.

Les résultats ont révélé que la trypsine est peu utile à cette étape et que les principaux éléments aidant la stimulation sont la chaleur et l'acidité. La trypsine est sécrétée par le pancréas et entre dans le petit intestin à un pH d'environ 8, ce qui correspond à son pH optimal d'activité. De plus, elle est peu active en-dessous de pH 6 (Sipos and Merkel, 1970). L'ajout de trypsine dans le milieu acide de stimulation (pH 1.5-3) a été conservé dans les développements de méthode

précédents (Johnson *et al.*, 2007; Rochelle, 2004) de manière traditionnelle car les premières générations d'essaies l'utilisaient (Di Giovanni *et al.*, 1999). Toutefois, cet ajout n'a pas de justification physiologique. Sur cette base, une protéase typique de l'estomac et active à pH acide, la pepsine a été testée. Celle-ci n'a d'ailleurs pas contribué à la génération de foyer plus nombreux. Il est aussi intéressant de noter que les conditions de stimulation n'engendrent pas l'excystation des sporozoites de l'oocyste avant leur transfert sur les cellules en culture. Une excystation prématurée pourrait biaiser l'estimation de la fraction infectieuse car un oocyste sécrétant jusqu'à quatre sporozoites pourrait générer de un à quatre foyers infectieux.

Les études *in vivo* de référence ont aussi leurs limitations, dont entre autres, le faible nombre d'études effectuées chez l'humain. Bien entendu, *C. hominis* est spécifique à l'homme mais il faut bien se rappeler que des espèces infectant plusieurs hôtes, tel que *C. parvum*, peuvent fort bien avoir des niveaux d'infectivité différents d'un hôte à l'autre ainsi que dans le même hôte, dépendamment de leur hôte d'origine. Dans l'étude de référence de Okhuysen (1999), trois souches de *C. parvum* ont été comparées sur des volontaires humains et les doses infectant 50% des sujets sont très variables, de 9 à 1 042 oocystes, démontrant qu'une même espèce d'oocystes infectant un même hôte peut avoir des doses infectieuses très variables. De plus, les doses infectieuses *in vivo* peuvent être calculées de différentes manières : apparition de symptômes cliniques (Chappell *et al.*, 2006; DuPont *et al.*, 1995; Okhuysen *et al.*, 1999), présence d'oocystes dans les fèces (Chappell *et al.*, 2006; DuPont *et al.*, 1995; Okhuysen *et al.*, 1999) ou présence d'oocystes dans le système digestif (Lindsay *et al.*, 2000; Rochelle *et al.*, 2002; Slifko *et al.*, 1999). De la même manière, les variations de l'infectivité sur les cellules en culture peuvent dépendre des génotypes ainsi que l'hôte ayant servi à leur propagation mais il est difficile d'en faire l'évaluation car seules quelques espèces et génotypes sont commercialement disponibles. Pour évaluer si ces sources de variabilité sont significatives, il faudrait maintenir d'autres espèces dans divers hôtes et les tester. Il est donc important de rester critique face aux extrapolations de dose-réponse, même développées à partir de la même espèce d'oocyste.

Un problème concernant les travaux réalisés a été de ne pas avoir réussi le génotypage suite à l'immunodétection afin de valider les espèces présentes et celles pouvant générer des foyers. Le

génotypage des foyers et des oocystes ainsi que des fractions purifiées par IMS a été tenté en collaboration avec Dr. George D. Di Giovanni. Cet échec a été causé par la faible concentration d'ADN provenant des oocystes par rapport à celles des cellules en culture, les inhibiteurs environnementaux (Jiang *et al.*, 2005a) ainsi que le développement en cours des méthodes.

Sans une validation rigoureuse des espèces capables d'infecter le tapis cellulaire, la spécificité de la méthode par 3D-CC-IFA peut être questionnée. Certains chercheurs ont développé des méthodes dans lesquelles *C. andersoni* et *C. muris* infectent des cultures de cellules du système digestif humain (Choi *et al.*, 2004; Wu *et al.*, 2009). La détection n'est pas effectuée en immunofluorescence mais plutôt en PCR et/ou en observations microscopiques directes en champs clair. Johnson *et al* (2010) ont comparé les détections par CC-IFA de *C. parvum*, *C. hominis*, *C. andersoni*, *C. muris* et *C. meleagridis*. Ils ont détecté par immunofluorescence en utilisant les mêmes anticorps qu'utilisent la 3D-CC-IFA des foyers provenant de *C. parvum*, *C. hominis* et de *C. meleagridis* mais pas de *C. andersoni* ni de *C. muris*. Ces anticorps sont dirigés contre les antigènes des sporozoïtes de *C. parvum* et proviennent du même producteur (SporoGlo de Waterborne). Il est donc possible que ces espèces non pathogéniques pour l'humain puissent infecter des cellules humaines en culture, mais il semble que leur immunodétection soit l'étape limitante. Cependant, il faut noter que les anticorps utilisés contre les oocystes détectent une grande variété d'espèces, dont *C. andersoni*, *C. baileyi* et les génotypes *C. muskrat* et cervine (Ruecker *et al.*, 2007). Les oocystes de *C. andersoni* et de *C. muris* sont ainsi détectés par la 3D-CC-IFA mais pas leurs foyers infectieux.

Certaines faiblesses méthodologiques sont inhérentes à la méthode 3D-CC-IFA dont la perte d'oocystes au niveau des manipulations et de la détection. En effet, comme les oocystes ne sont pas tous retenus sur les cellules, on doit procéder à leur récupération dans les eaux de lavages post-infection. Les raisons et solutions à ce manque de rétention n'ont pas été identifiées malgré plusieurs investigations concernant l'impact de la viabilité, d'un volume initialement inoculé plus faible, de l'addition d'une protéase spécifique, d'augmentation du temps d'infection (section 4.4.6). La littérature scientifique a identifié plusieurs molécules d'attachement des sporozoïtes (Carey *et al.*, 2004), mais peu d'informations sur les mécanismes d'ancrage spécifiques aux



oocystes sont disponibles (Fayer and Xiao, 2007). De plus, lors des analyses de performance de la méthode (Figure 4.7), une part importante d'oocystes comptés en cytométrie à flux non pas été retrouvés (30%). Ce niveau de perte est acceptable du fait que la méthode repose sur de nombreuses manipulations et que cette perte est stable lorsque les étapes de la 3D-CC-IFA sont testées en eau MilliQ. Toutefois, il apporte un biais important sur les concentrations estimées pour la détection d'événements rares. Enfin, l'immunodétection avec des fluorochromes d'émissions différentes est pratique pour la différenciation des oocystes et des foyers. Cependant, lors du déploiement de la méthode sur plusieurs échantillons provenant de matrices chargées, passer deux fois sous l'œil du microscope chaque échantillon devenait trop fastidieux. C'est ainsi que pour la campagne d'échantillonnage, nous avons opté pour deux anticorps marqués avec le même fluorochrome, jugeant qu'il était aisé de différencier les phases de vie infectieuse des oocystes.

Finalement, comme la 3D-CC-IFA offre la détection du sous-ensemble infectieux des oocyste de *Cryptosporidium*, il importe de viser des catégories d'échantillons contenant un nombre suffisant d'oocystes afin d'avoir des résultats intéressants à analyser. Rappelons que la présence d'oocystes demeurent un événement rare et de faibles concentrations dans beaucoup d'eaux de surface, la quête de leur fraction infectieuse peut s'avérer contenir de nombreuses et décevantes valeurs nulles.

## **7.2 À la recherche du *Crypto* des villes et du *Crypto* des champs**

Les campagnes d'échantillonnage avaient pour but de mesurer les comptes totaux et infectieux dans l'optique d'estimer les fractions infectieuses présentes dans les eaux de surfaces alimentant des stations de production d'eau potable. Cependant, en raison des faibles concentrations d'oocystes totaux retrouvées dans ces eaux, la mesure d'un sous-ensemble infectieux n'était pas possible. Conservant le même objectif général, celui de définir la fraction infectieuse des oocystes dans les eaux de surfaces, nous avons ciblé des sources ayant des concentrations d'oocystes plus importantes ont été ciblées. Comme elles sont diverses, les sources de pollution fécale pouvant contenir des espèces d'oocystes pathogènes pour l'humain ont été privilégiées. C'est ainsi que, pour l'écosystème urbain, les STEP ont été ciblées tandis que pour l'écosystème

rural, les productions laitières ont été sélectionnées. Parallèlement à *Cryptosporidium*, les kystes totaux et viables de *Giardia* ont aussi été mesurés, leurs concentrations étant aussi réglementées en eaux potables. De plus, sa détection se réalise facilement conjointement à *Cryptosporidium* et ses concentrations sont historiquement plus élevées dans nos eaux de surfaces (Payment, 2003; Payment *et al.*, 2000; Payment *et al.*, 2001).

L'application de la 3D-CC-IFA dans plusieurs matrices environnementales complexes constitue la première réalisation de cette étape du projet de doctorat. Les étapes en amont de la détection, c'est-à-dire la concentration et l'isolation des (oo)cystes, ont été optimisées pour les eaux usées, les fèces fraîches et le fumier. Ces étapes avaient antérieurement été développées principalement pour la détection totale menée dans les eaux de surface. La deuxième réalisation est l'estimation des fractions infectieuses et de ses prévalences dans les sources dominantes de pollution fécale contenant des oocystes pathogéniques pour l'humain. Ces estimations montrent une certaine variabilité qui reflète certainement les contraintes méthodologies mais aussi probablement la variabilité de cette fraction. Les valeurs de ces fractions surestiment probablement les fractions retrouvées dans les eaux brutes de station de production d'eau potable, car elles ne tiennent pas compte de l'atténuation des oocystes dans les cours d'eau. Finalement, les concentrations d'(oo)cystes totaux et infectieux dans les eaux usées et les fèces de vaches laitières sont des estimations nouvelles qui représentent une autre contribution intéressante des travaux.

Plusieurs observations et conclusions intéressantes ont pu être tirées des travaux d'application de la méthode 3D-CC-IFA soumise à une variété des types d'échantillons environnementaux. En effet, la même méthode de détection d'oocystes appliquée sur des eaux usées (affluents et effluents), des fèces (veau, vache, fumier) et à l'exutoire d'un bassin-versant agricole permet de meilleures comparaisons entre les résultats totaux et infectieux. Les rares résultats dans la littérature scientifique ont été obtenus avec des méthodes différentes. Or, ces différences de protocoles de détection de l'infectivité de *Cryptosporidium* (Tableau 4.1) peuvent introduire des biais supplémentaires aux résultats qui diminuent la capacité de comparaison. De plus, les taux de récupérations totaux ont été testés pour chaque matrice afin de pouvoir corriger les valeurs mesurées avec les performances propres à chacune, ce qui n'est pas le cas pour la majorité des

études (Gennaccaro *et al.*, 2003; McCuin and Clancy, 2006; Olson *et al.*, 1997; Robertson *et al.*, 2006; Starkey *et al.*, 2005). Finalement, ces taux de récupération ont été mesurés à partir de concentrations initialement ajoutées constantes, ce qui facilite la comparaison entre les résultats provenant de différentes matrices. Il est en effet reconnu qu'un inoculum initialement plus important offre des taux de récupération plus élevés (Messner and Wolpert, 2002; Robertson *et al.*, 2000; Xiao and Herd, 1993). Nous avons aussi mis en place un second contrôle interne par l'ajout dosé d'oocystes infectieux, ce qui soutient l'absence d'effet des matrices sur l'infectivité à court terme. La constance observée des fractions infectieuses des références (Tableau 5.1) supportent l'hypothèse que la 3D-CC-IFA est une méthode qui fournit des estimés fiables et répétitifs.

Les analyses de viabilité des kystes de *Giardia* ont montré des pourcentages de kystes viables systématiquement plus élevés que ceux d'oocystes infectieux de *Cryptosporidium*. Ils témoignent des conséquences de l'application de critères moins discriminants. La distribution ayant un mode de 40% d'infectivité utilisée par le US EPA (2005a) dans leur analyse économique de *Cryptosporidium* a été élaborée en partie avec la fréquence d'observation de structures internes des oocystes, un critère aussi moins discriminant (Section 4.2). Ces structures internes peuvent inclure la présence de sporozoïtes et de leur noyau, un dénombrement qualifié de viable (Section 2.4.2). Rappelons que *Giardia* est moins résistant que *Cryptosporidium* (Quintero-Betancourt *et al.*, 2003) et que la viabilité mesurée chez *Giardia* repose sur la présence d'ADN dans les parasites. Pour la 3D-CC-IFA, l'observation de l'ADN et des structures internes s'est avérée très difficile, voir impossible étant donné le fort bruit de fond associé aux cellules en culture.

Autre fait intéressant à discuter porte sur les comptes totaux de *Cryptosporidium* et *Giardia* en milieu rural et urbain. Les valeurs des dénombrements obtenus sont comparables à celles publiées (Tableau 6.1) quoique plus faibles que certaines valeurs extrêmes (Fayer *et al.*, 1998; Robertson *et al.*, 2006; Starkey *et al.*, 2007). Les fractions infectieuses mesurées dans la présente étude seraient vraisemblablement plus près de la réalité, ce qui contribue à renforcer la valeur des estimations de risque. La prise en compte d'infectivité est de plus cohérente avec les cas très peu nombreux de cryptosporidiose déclarés dans les régions étudiées. Le registre des maladies à

déclaration obligatoire du Ministère de la Santé et des Services Sociaux ne rapporte que quelques cas de cryptosporidiose et de giardase dans les municipalités concernées. Il faut aussi considérer que les animaux infectés n'ont pas été identifiés comme malades : ils auraient été mis à l'écart du troupeau le cas échéant. Il est cependant possible que certaines valeurs plus élevées de production unitaire d'oocystes soient associés à des animaux malades (cas des *super shedders*).

Certaines limites des résultats d'échantillonnage environnemental méritent aussi d'être soulignées. En raison de la lourdeur des analyses de laboratoire retenues, la stratégie d'échantillonnage adoptée a résulté d'un compromis entre la mesure dans de nombreuses sources de pollution fécale et le suivi des variations temporelles dans chacune de ces sources. Le nombre d'échantillons à chaque site a dû être limité, ce qui diminue la puissance statistique des données et limite peut-être l'établissement de corrélations avec les indicateurs ainsi que la définition de fonctions de probabilité (Section 7.3). De plus, le programme d'échantillonnage était aléatoire ne ciblait pas les événements de pointe (e.g. précipitation) et n'a pas couvert une année entière afin de vérifier l'impact de la fluctuation des saisons. Pour saisir de tels impacts, plusieurs années d'échantillonnage systématique seraient nécessaires, ce qui n'était pas compatible avec le calendrier de réalisation des présents travaux. Il aurait aussi été intéressant d'analyser d'autres milieux ruraux et urbains à titre comparatif. Toutefois, la stratégie retenue a permis d'atteindre le principal objectif, soit l'estimation de la fraction infectieuse provenant de sources de contamination fécale variées et non pas de réaliser une étude écologique des parasites.

Autre élément d'ordre méthodologique, les volumes échantillonnés n'étaient pas constants pour les échantillons prélevés à l'exutoire et aux STEP, comme c'est le cas dans la majorité des études publiées. Le critère limitant ces échantillonnages reposait sur la charge hétérogène présente dans les eaux, évaluée en termes de capacité de filtration pour la cartouche (échantillon à l'exutoire) et de la centrifugation d'un culot de 0.5 ml (échantillons d'eaux usées). Ceci avait pour but d'améliorer la détection: un échantillon provenant d'une matrice trop chargée contiendrait beaucoup d'interférences limitant ainsi la récupération (DiGiorgio *et al.*, 2002; Feng *et al.*, 2003; Francy *et al.*, 2004; Kuhn *et al.*, 2002; Messner and Wolpert, 2002; Petterson *et al.*, 2007; Rochelle *et al.*, 1999) et l'examen microscopique. S'appuyant sur une vaste base de données, il

apparaît que les compromis méthodologiques sont associés à des limites de détection et de récupération variables (Messner and Wolpert, 2002).

Toujours au niveau des taux de récupération, un choix pratique de trois à quatre répliques par matrice a été fait, sauf pour l'exutoire (10) et le fumier (1) (Tableau 5.1). Quoique ces valeurs soient cohérentes avec les valeurs publiées (Section 5.5), une part d'incertitude demeure considérant leur nombre restreint. L'analyse statistique de Petterson *et al* (2007) souligne que l'utilisation de quelques points de taux de récupération donne des estimés acceptables pour évaluer les moyennes et les 95<sup>e</sup> percentiles. Cependant, un nombre minimal de 20 analyses de taux de récupération est nécessaire pour leur application en analyse de risque afin de diminuer l'incertitude. L'impact de ses taux de récupération sur les estimés de concentration doit être cependant être mis en perspective. Corriger un compte total avec des valeurs de récupération moyennes variant de 12 à 30% (Tableau 5.1) affectera les concentrations finales jusqu'à 2.5 fois. Lorsque rationalisé en termes microbiologique à une échelle logarithmique (Figures 5.1; 5.3), cette augmentation par un facteur de 2.5 fois n'apporte pas une variation majeure de concentration ou de risque.

Lors de la campagne d'échantillonnage, les matrices de fèces apportaient beaucoup plus d'interférences visuelles sur les cellules en culture que les matrices d'eau de surface concentrées. En effet, les fèces adsorbaient de manière non spécifique les anticorps marqués, ce qui générerait un important bruit de fond. Une méthode additionnelle a donc dû être développée. Trois protocoles de purification d'oocystes (données non incluses) ont d'abord été comparés par ajout dosé d'oocystes dans des fèces: le protocole utilisé par l'IRDA utilisant un détergeant, de la filtration et de la centrifugation, le protocole de Davies *et al* (2003) (section 5.3.2), et un protocole de séparation sur gradient de Percoll-Sucrose (USEPA, 1996). Les récupérations se sont révélées décevantes pour le premier et le dernier et l'interférence des matrices ont toutes été aussi importantes dans les trois cas. Le protocole de Davies *et al* (2003) a été retenu pour ses taux de récupération améliorés. Cependant, pour régler le problème d'interférences lors des observations microscopiques, différentes alternatives de détection ont été étudiées pour ainsi pratiquer de l'immunodétection indirecte (anticorps anti-sporozoïtes non marqués produits dans

les rats plus anticorps anti-rat marqués) pour la détection des foyers, plutôt que l'immunodétection directe (anticorps anti-sporozoïtes marqués). Avec cette approche, la lecture d'échantillon est devenue réalisable.

Concernant l'évaluation des fractions infectieuses, un nombre d'échantillons plus élevé par site aurait permis de mieux confirmer les valeurs présentées. Bien que les faibles concentrations mesurées soient une bonne nouvelle pour la qualité des eaux de surface, un total de 9/97 échantillons contenait des foyers infectieux : 5/36 dans les eaux usées; 4/41 dans les fèces; 0/10 dans le fumier; et aucun dans l'eau à l'exutoire.

Finalement, faute de possibilités de génotypage, les sources autres qu'humaines pour les STEP et de bovins pour le milieu rural, n'ont pas été considérées. Bien que la faune puisse être contaminée par *C. parvum*, la présence d'espèces plus spécifiques aurait pu amener quelques hypothèses sur leurs origines. Par exemple, la présence de *C. hominis* en milieu rural supposerait une contamination d'installations septiques ou d'eau usées humaines tandis que la présence de *C. muris* dans les égouts appuierait la contribution des rongeurs. Considérant la charge d'excrétion produite par les bovins et leur nombre important dans les régions de production laitière ainsi que la charge d'excrétion d'humain et leur concentration en milieu urbain, on peut tout de même croire que les sources échantillonnées durant cette étude constituent les principales sources fécales des secteurs étudiés.

De manière concrète, la campagne d'échantillonnage de ce projet a d'abord permis de valider avec succès la méthode 3D-CC-IFA par des mesures de taux de récupération et de contrôles stables des fractions infectieuses dans plusieurs matrices complexes ainsi que la concentration et l'isolation des parasites *Cryptosporidium* et *Giardia*. Ces premières estimations directes des fractions infectieuses viennent nourrir les modèles de risque et fournissent une critique additionnelle contre l'utilisation de la viabilité comme marqueur très conservateur de l'infectivité de *Cryptosporidium*. La documentation des concentrations de *Cryptosporidium* et de *Giardia* fournit aussi des valeurs de référence pour le Québec.

### 7.3 Élaboration d'outil de prédiction simple et pratique pour les traiteurs d'eau

Le dernier chapitre de recherche de cette thèse propose un outil pour estimer l'importance relative des charges d'oocystes totaux et infectieux provenant de sources rurales et urbaines. Cet outil constitue un modèle de charges d'oocystes émises par les humains via les eaux usées et le bétail d'élevage laitier. Afin de démontrer la pertinence de développer et d'utiliser de tels modèles de charges, les outils présentement utilisés pour estimer la présence des oocystes dans les eaux de surface, c'est-à-dire, les indicateurs, y sont d'abord critiqués.

La démarche de recherche des travaux présentés au Chapitre 5 débute par une revue de littérature réalisée pour montrer que les variations de turbidité et d'indicateurs microbiens ne sont pas corrélées à celles des parasites. Ils ne peuvent donc pas être utilisés pour prédire la présence, la concentration, le transport, l'enlèvement et la mortalité des oocystes de *Cryptosporidium*. Par la suite, les faibles corrélations observées entre l'enlèvement par les STEP de la turbidité et des indicateurs microbiens et celui des oocystes tel qu'observées durant nos campagnes d'échantillonnage ainsi dans la littérature sont discutées. Les comportements distinctifs dans des sources et des environnements étudiés peuvent être mis en évidence en utilisant des ratios retrouvés dans les effluents des STEP ainsi qu'à l'exutoire rural. Une analyse des relations entre les charges et les concentrations de *Cryptosporidium* à l'exutoire en fonction de la pluviométrie cumulée apporte ensuite des éléments additionnels de compréhension. Finalement, des modèles de charges quotidiennes émises par les humains en milieu urbain et par les bovins en milieu rural ont été développés et appliqués à des distributions de concentrations de base et extrêmes. Ces modèles peuvent être utilisés pour évaluer l'importance relative et les impacts des différentes sources d'oocystes dans nos bassins-versants.

La revue bibliographie a démontré que les informations sur la présence et le devenir environnemental des oocystes de *Cryptosporidium* et des indicateurs retrouvés dans les eaux de surface sont peu nombreuses et mènent à des conclusions contradictoires. L'enlèvement des oocystes et autres paramètres par les STEP donne une première démonstration de comportements

différents. Les enlèvements observés sont plus faibles pour les oocystes que ceux de turbidité, de MES ainsi que des indicateurs microbiens dans les deux STEP visées par notre échantillonnage ainsi qu'à six STEP analysées par Rose *et al* (2004). Des enlèvements légèrement plus élevés de *Giardia* sont aussi notés. Aussi, les ratios calculés combinant *E. coli* et les indicateurs ne discriminent pas les sources en milieu urbain et rural, sauf pour le ratio *E. coli/Enterococci*. D'autres conclusions importantes concernent le transport par le lessivage des sols agricoles. La plus haute concentration observée de *Cryptosporidium* à l'exutoire correspond à la journée de plus forte pluie, mais les concentrations d'entérocoques et de *Giardia* n'ont pas augmenté. Lorsqu'exprimée en charges, la relation entre les oocystes et la pluviométrie montre un impact beaucoup plus modeste de la pluviométrie que lorsque les concentrations sont prises en compte. L'effet de dilution associé à l'augmentation des débits de ruissellement est manifeste. C'est pourquoi les charges d'oocystes totaux et infectieux excrétés quotidiennement par les animaux et par les habitants apportent une meilleure mesure pour évaluer les valeurs possibles de concentrations résultantes sans le milieu récepteur.

L'estimé des abattements par les STEP est un des apports positifs de cette partie des travaux. Les résultats d'enlèvements d'oocystes mesurés dans les deux STEP et ceux retrouvés dans une large étude (Rose *et al.*, 2004) ont été comparés avec les enlèvements de différents indicateurs (Figure 6.1). Les faibles enlèvements d'oocystes dans les STEP concordent avec ceux rapportés par les travaux recherches antérieurs (Crockett, 2007; Robertson *et al.*, 2000; Rose *et al.*, 2004). Les abattements d'indicateurs microbiens corrélaient bien entre eux (Dechesne *et al.*, 2006) mais pas avec ceux d'oocystes (Dechesne *et al.*, 2006; Rose *et al.*, 2004; Wohlsen *et al.*, 2006). Le traitement de données utilisé pour estimer l'étendue possible des abattements est un calcul de ratio journalier, comme par exemple l'étude de Robertson *et al* (2000). Ce type d'estimation ne devrait pas être utilisée pour estimer des charges annuelles. Les charges totales annuelles à l'affluent et des effluents sont influencées par les fluctuations journalières par un facteur de 10X des flux massiques de charge bactériennes et de débits (Payment, 2003).

Une deuxième contribution de cette partie des travaux est d'avoir démontré que l'utilisation des charges expliquait mieux les comportements environnementaux des microorganismes que les



concentrations. En milieu agricole, le débit des cours d'eau récoltant les eaux de drainage des sols est fortement influencé par les pluies ainsi que par les événements de gel et de fonte des neiges. Pour le ruisseau Au Castor, les débits observés pour l'année 2009 varient par un facteur de 1000X ce qui influence directement la variation des concentrations mesurées (Figure 6.2). Ces niveaux dilutions dans le milieu récepteur ne devraient pas modifier les relations entre les indicateurs et parasites lorsqu'échantillonnés au même moment. Toutefois, il est reconnu que la taille des microorganismes, leur adhérence, les mécanismes de transport et les réservoirs varient selon les espèces considérées. De ce fait, les travaux d'enlèvement d'oocystes faits à l'échelle laboratoire considèrent les charges d'oocystes récupérés versus celles initialement appliquées (Atwill *et al.*, 2006b; Tate *et al.*, 2004) mais les études environnementales emboîtent rarement le pas et préfèrent travailler sur la base des concentrations (Cinque and Jayasuriya, 2010; Kistemann *et al.*, 2002). Les concentrations dans le milieu récepteur ont un intérêt direct pour l'évaluation de la qualité des eaux à potabiliser et des eaux récréatives, car elles déterminent la dose d'exposition et servent de bases aux normes. Les charges procurent une meilleure base pour expliquer des variations temporelles (saisonnnières, contamination lors d'évènements de pluie ou de fonte).

Finalement, un dernier point positif à faire valoir est l'estimation de l'enlèvement en milieu rural des oocystes. En effet, la modélisation proposée permet d'estimer l'atténuation des charges d'oocystes entre le parc de production, de stockage et d'épandage et la fuite à l'exutoire. L'enlèvement et le taux de mortalité des oocystes via les traitements du fumier et sur les terres agricoles reposent sur des mécanismes complexes et hétérogènes car spécifiques aux sols, à la pluviométrie, aux habitudes fermières et à l'épidémiologie. Une modélisation stochastique non mécanistique offre une vision globale qui peut constituer une alternative intéressante aux modélisations mécanistiques limitées par de nombreuses incertitudes (Ferguson *et al.*, 2003). En effet, les modèles de transport ont jusqu'à ce jour été élaborés et validés à l'échelle du laboratoire et pilote. L'application de ces modèles est possible à l'échelle du bassin versant (Cinque *et al.*, 2010) mais leur validation est ardue (Ferguson *et al.*, 2010).

Il existe plusieurs limitations aux présents travaux de recherche sur la prédiction des concentrations et des charges de parasites et d'indicateurs.

Premièrement, la littérature présente peu d'études permettant concrètement de comparer les indicateurs et *Cryptosporidium* en raison de la diversité des méthodes de détection, de traitement des données, des sources de pollution fécales, des mécanismes de transport, des facteurs de mortalité, du climat/saison, des événements de pointe, de la chimie de l'eau et des sols, etc. (Tableau 6.1). D'ailleurs, l'US EPA (dans certains cas) et le MDDEP ont adopté une démarche fortement simplifiée utilisant des seuils de concentrations moyennes d'*E. coli* pour classer le niveau de contamination des sources d'eau de surface (rivière, lac/réservoir) et prédire la probabilité associée de présence des concentrations moyennes appréciables d'oocystes (McGuire *et al.*, 2002; MDDEP, 2005).

Le choix de plusieurs sources de pollution fécale a limité le nombre de répétitions à chaque site, le nombre de replicata et la force statistique. Dans les cas de calculs des ratios et de l'enlèvement, les dénombrements sous les limites de détection peuvent être retirées des analyses de manière à ne pas sous-estimer les abattements, être fixées à la limite de détection (Rose *et al.*, 2004) ou à la moitié de limite de détection. Par exemple, lors du calcul de l'enlèvement des STEP locales, les faibles concentrations de *Cryptosporidium* à l'eau brute pourrait mener à une sous-estimation de l'enlèvement maximal en raison des limites méthodologiques (Rose *et al.*, 2004).

Au niveau des analyses d'échantillons prélevés à l'exutoire, la plus forte concentration d'oocystes observée dans les campagnes réalisées a été observée lors de la plus intense pluie. Le lessivage des sols créé par les fortes précipitations de cette journée est avancé comme la cause de cette pointe. Il est aussi possible que cette pointe ait été associée à d'autres origines telles qu'un rat musqué, un chien ou un bovin malade ayant accédé et contaminé le ruisseau. Une contamination animale fécale directe à proximité du lieu d'échantillonnage apparaît cependant peu probable car les indicateurs fécaux n'ont pas augmenté. Il est aussi possible que les fortes précipitations aient provoqué la resuspension des sédiments. Malgré que toutes ces hypothèses soient plausibles, il est plus probable que les oocystes provenaient du lessivage des sols.

Une autre faiblesse des modèles de charges est la validation des distributions de probabilités. La relative rareté des données, particulièrement de données d'oocystes infectieux, n'a pas permis d'établir avec certitude des distributions de probabilité lorsque le nombre d'analyses était limité.

Pour plusieurs groupes de données, l'utiliser des distributions 'sur mesure' (custom) a dû être préconisée, ce qui est un choix statistique de dernier recours.

Pour terminer, les principales retombées de cette partie des travaux sont de permettre une utilisation plus informée des indicateurs pour comprendre la présence et les risques associés à *Cryptosporidium*. Il apparaît plus opportun d'utiliser des charges d'oocystes plutôt que des concentrations pour expliquer le comportement et le transport des microorganismes dans les sols. Cependant, les concentrations demeurent la clé dans la compréhension de l'impact des oocystes en traitement de l'eau et en santé publique.

## CHAPITRE 8. CONCLUSION ET RECOMMANDATIONS

Au niveau du développement méthodologique, il est d'abord possible de conclure que l'optimisation selon un rationnel physiologique des milieux de prétraitement et de stimulation favorise un plus grand nombre de foyers infectieux sur les cellules en culture. Aussi, de manière importante, la combinaison des comptes totaux et infectieux sur le même échantillon permet une évaluation plus précise de la fraction infectieuse que les protocoles antérieurs. Finalement, la méthode 3D-CC-IFA offre des performances de récupération comparables aux méthodes standardisées de comptes totaux. Elle représente un pas de plus dans l'avancement des méthodes d'infectivité de *Cryptosporidium*.

Pour aller plus loin, il serait principalement recommandé de travailler sur l'amélioration des méthodes de concentration et d'isolation en amont de la détection 3D-CC-IFA. Les objectifs de concentrer de plus grands volumes d'eau tout en éliminant plus efficacement les débris seraient à explorer. Des techniques telles que la centrifugation en continue pour la concentration et l'extraction des oocystes agglomérés aux particules pour l'isolation pourraient être tentées. Bien entendu, les pertes d'oocystes devraient être minimisées dans tous les cas. Aussi, il serait important d'intégrer le génotypage comme outil de confirmation et de recherche de la source de pollution plus spécifique. Ceci contribuerait aussi à valider les espèces pouvant être détectées par la 3D-CC-IFA. De plus, la 3D-CC-IFA pourrait être exploitée lors d'analyses de désinfections tant en eaux potable qu'en eaux usées. Des essais contrôlés en laboratoire seraient facilement réalisables et combleraient un grand vide dans la littérature, spécialement en eaux usées.

Concernant les conclusions à tirer de la campagne d'échantillonnage, notons d'abord le succès de l'application de la méthode 3D-CC-IFA et de la méthode 1623 pour *Giardia* dans de multiples matrices environnementales complexes. Ce succès est attribuable au bon développement des étapes de concentration et d'isolation en amont de chacune des matrices. Les résultats soulignent une contribution variable en oocystes totaux et infectieux des milieux ruraux et urbains influençant les eaux de surface. En effet, la prévalence d'oocystes totaux est plus forte dans les eaux de drainage agricole tandis que les oocystes infectieux sont prédominants dans les rejets d'eaux usées. Les comptes totaux des deux milieux peuvent être comparés aux comptes de base

observés par d'autres études. Les fractions infectieuses sont plus élevées aux affluents (20%) qu'aux effluents (7%) des STEP et inférieures au mode de 40% utilisées par le US EPA (2005a) et ce, sans tenir compte de l'atténuation environnementale. Les veaux ont une prévalence plus élevée d'oocystes infectieux tandis que les vaches ont sporadiquement une fraction infectieuse plus importante. Les fumiers ainsi que les échantillons pris à l'exutoire ne contenaient pas de foyers infectieux.

Au niveau des recommandations concernant de la campagne d'échantillonnage, il serait intéressant de cibler des événements de pointe. En milieu urbain, la caractérisation des oocystes présents dans les CSO seraient une bonne piste à suivre. En effet, une étude sur *Giardia* a démontré que les CSO contribuent plus en charge annuelle de *Giardia* que les effluents d'eaux usées (Rechenburg *et al.*, 2006). L'étude des fractions liées provenant de la resuspension des dépôts de CSO et des fractions libres pourrait y être intégrée en comparant les charges et les pourcentages d'infectivité de ses deux partis (Passerat *et al.*, 2010). Pour le milieu rural, les mécanismes de transport et d'atténuation environnementale offrent beaucoup de possibilité d'études plus approfondies sur le terrain (Ferguson *et al.*, 2010). La méthode 3D-CC-IFA pourrait être appliquée pour estimer l'abattement des fractions infectieuses dans les traitements des fumiers ainsi que lors de l'épandage dans les champs sous différentes conditions météorologiques.

Touchant cette dernière partie, les premières conclusions à tirer reposent sur les relations entre *Cryptosporidium* et les indicateurs sélectionnés. L'enlèvement des oocystes par les STEP, leur présence dans les effluents d'eaux usées ainsi que dans les exutoires ruraux ne peuvent être clairement expliqués par la turbidité et les indicateurs microbiens sélectionnés. Par la suite, les modèles de charges quotidiennes en humain ou animaux équivalents estiment et nuancent les contributions en oocystes totaux et infectieux de base et extrêmes entrant dans les eaux de surfaces. Les différences entre les charges totales et infectieuses en milieu urbain varient de 0.9 à 1.6 log selon la statistique et le scénario choisis. Les charges totales d'humain et d'animaux sont relativement semblables mais aucun oocyste infectieux n'a été détecté à l'exutoire.

À propos des recommandations pour partie de l'étude, il serait d'abord approprié d'approfondir la compréhension de l'enlèvement des oocystes ainsi que leur désinfection par les STEP. Comme les installations de traitement à l'échelle municipale reçoivent des eaux peu chargées en oocystes, des études pilotes avec des ajouts dosés pourraient venir combler ce manque de connaissance. Aussi, pour les modèles de charge, le pas suivant à franchir est de modéliser un bassin-versant pour ses sources de contamination, de vérifier la capacité d'abattement des oocystes à la station de production d'eau potable et d'estimer le risque pour le consommateur de contracter une cryptosporidiose.

De manière générale pour l'ensemble du projet, la quête de la fraction infectieuse des oocystes de *Cryptosporidium* n'a pas révélé une valeur unique. Elle a plutôt produit des modèles précisant les ordres de grandeur nuancés selon l'origine de la pollution fécale, tout en diminuant immanquablement les évaluations antérieures.

Rappelons que les américains utilisent pour leurs nouvelles normes d'abattement des oocystes de *Cryptosporidium*, les comptes totaux aux eaux brutes d'usines de station de production d'eau potable et les corrigent avec une distribution d'infectivité ayant un mode de 40%. Les augmentations des coûts de traitement associés à ce parasite ont été estimées de 92 à 133 million de dollar américain par an (USEPA, 2005a). L'évaluation à la baisse de la fraction infectieuse retrouvée à l'entrée des stations éviterait bien évidemment une partie non négligeable de ces dépenses.

Au Québec, des études faites par les chercheurs (Côté *et al.*, 2006; Graczyk *et al.*, 2001; Lévesque *et al.*, 2006; Payment *et al.*, 2000; Ruest *et al.*, 1998) et par quelques rares stations (Jaidi *et al.*, 2009) démontrent que généralement, peu d'oocystes sont présents dans la source d'eau. L'obligation minimale de traitement pour des eaux traitées à partir d'eau de surface est de 2 log. Ceci offre une protection au passage d'oocystes en période de contamination moyenne mais ne permet pas forcément le passage d'oocystes infectieux et d'éclosions causés par une série d'évènements tels que survenus dans les villes de Walkerton (Ont.), de Milwaukee (WI) et de North Battleford (Sask). La prévention demeure l'option la plus sécuritaire. Ainsi, diminuer la présence des oocystes dans les eaux de surfaces reste la meilleure approche pour garantir la F

## CHAPITRE 9. BIBLIOGRAPHIE

- Aboytes, R., Di Giovanni, G.D., Abrams, F.A., Rheinecker, C., Mcelroy, W., Shaw, N., LeChevallier, M.W., 2004. Detection of infectious *Cryptosporidium* in filtered drinking water. *Journal of the American Water Works Association* 96, 88-98.
- Amann, R.I., Ludwig, W., Schleifer, K.-H., 1995. Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiological Reviews* 59, 143-169.
- Appelbee, A.J., Frederick, L.M., Heitman, T.L., Olson, M.E., 2003. Prevalence and genotyping of *Giardia duodenalis* from beef calves in Alberta, Canada. *Veterinary Parasitology* 112, 289-294.
- Ashbolt, N.J., Grabow, W.O.K., Snozzi, M., 2001. Indicators of microbial water quality. In water quality: guidelines, standards and health risk assessment and management for water-related infectious disease (Chapter 13), Chapter 13 ed. International Water Association (IWA) Publishing and World Health Organization (WHO), L. Fewtrell and J. Bartram (editions), London, United Kingdom.
- Atherholt, T.B., LeChevallier, M.W., Norton, W.D., Rosen, J.S., 1998. Effect of rainfall of *Giardia* and *Crypto*. *Journal of the American Water Works Association* 90, 66-80.
- Atwill, E.R., Pereira, M.D.G.C., A.L., H., Elmi, C., Epperson, W.B., Smith, R., Riggs, W., Carpenter, L.V., Dargatz, D.A., Hoar, B., 2006a. Environmental load of *Cryptosporidium parvum* oocysts from cattle manure in feedlots from the central and western United States. *Journal of Environmental Quality* 35, 200-206.
- Atwill, E.R., Tate, K.W., Pereira, M.D.C., Bartolome, J., Nader, G., 2006b. Efficacy of natural grassland buffers for removal of *Cryptosporidium parvum* in rangeland runoff. *Journal of Food Protection* 69, 177-184.
- Atwill, E.R., Hou, L., Karle, B.M., Harter, T., Tate, K.W., Dahlgren, R.A., 2002. Transport of *Cryptosporidium parvum* oocysts through vegetated buffer strips and estimated filtration efficiency. *Applied and Environmental Microbiology* 68, 5517-5527.

- Barta, J.R., Thompson, R.C.A., 2006. What is *Cryptosporidium*? Reappraising its biology and phylogenetic affinities. *Trends in Parasitology* 22, 463-468.
- Bednarska, M., Bajer, A., Sinski, E., Girouard, A.S., Tamang, L., Graczyk, T.K., 2007. Fluorescent in situ hybridization as a tool to retrospectively identify *Cryptosporidium parvum* and *Giardia lamblia* in samples from terrestrial mammalian wildlife. *Parasitology Research* 100, 455-460.
- Bertrand, I., Schwartzbrod, J., 2007. Detection and genotyping of *Giardia duodenalis* in wastewater: relation between assemblages and faecal contamination origin. *Water Research* 41, 3675-3682.
- Betancourt, W.Q., Rose, J.B., 2004. Drinking water treatment processes for removal of *Cryptosporidium* and *Giardia*. *Veterinary Parasitology* 126, 219-234.
- Black, E.K., Finch, G.R., Taghi-Kilani, R., Belosevic, M., 1996. Comparison of assays for *Cryptosporidium parvum* oocysts viability after chemical disinfection. *Fems Microbiology Letters* 135, 187-189.
- Bohak, Z., 1969. Purification and characterization of chicken pepsinogen and chicken pepsin. *The Journal of Biological Chemistry* 244, 4638-4648.
- Bolton, J.R., Linden, K.G., 2003. Standardization of methods for fluence (UV Dose) determination in bench-scale UV experiments. *Journal of Environmental Engineering* 129, 209-215.
- Broglia, A., Reckinger, S., Caccio, S.M., Nockler, K., 2008. Distribution of *Cryptosporidium parvum* subtypes in calves in Germany. *Veterinary Parasitology* 154, 8-13.
- Bukhari, Z., Holt, D.M., Ware, M.W., Schaefer III, F.W., 2007. Blind trials evaluating in vitro infectivity of *Cryptosporidium* oocysts using cell culture immunofluorescence. *Canadian Journal of Microbiology* 53, 656-663.
- Bukhari, Z., Marshall, M.M., Korich, D.G., Fricker, C.R., Smith, H.V., Rosen, J., Clancy, J.L., 2000. Comparison of *Cryptosporidium parvum* viability and infectivity assays following ozone treatment of oocysts. *Applied and Environmental Microbiology* 66, 2927-2980.
- Bukhari, Z., Hargy, T.M., Bolton, J.R., Dussert, B., Clancy, J.L., 1999. Medium-pressure UV for oocyst inactivation. *Journal of the American Water Works Association* 91, 86-94.



- Cacciò, S.M., Thompson, R.C.A., McLauchlin, J., Smith, H.V., 2005. Unravelling *Cryptosporidium* and *Giardia* epidemiology. *Trends in Parasitology* 21, 430-437.
- Campbell, A.T., Robertson, L.J., Smith, H.V., 1992. Viability of *Cryptosporidium parvum* oocysts: correlation of in vitro excystation with inclusion or exclusion of fluorogenic vital dyes. *Applied and Environmental Microbiology* 58, 3488-3493.
- Carey, C.M., Lee, H., Trevors, J.T., 2006. Comparison of most probable number-PCR and most probable number-foci detection method for quantifying infectious *Cryptosporidium parvum* oocysts in environmental samples. *Journal of Microbiological Methods* 67, 363-372.
- Carey, C.M., Lee, H., Trevors, J.T., 2004. Biology, persistence and detection of *Cryptosporidium parvum* and *Cryptosporidium hominis* oocyst. *Water Research* 38, 818-862.
- Chappell, C.L., Okhuysen, P.C., Langer-Curry, R., Widmer, G., Akiyoshi, D.E., Tanriverdi, S., Tzipori, S., 2006. *Cryptosporidium hominis*: experimental challenge of healthy adults. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 75, 851-857.
- Chappell, C.L., Okhuysen, P.C., Sterling, C.R., Wang, C., Jakubowski, W., Dupont, H.L., 1999. Infectivity of *Cryptosporidium parvum* in healthy adults with pre-existing anti-C. Parvum serum immunoglobulin G. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 60, 157-164.
- Charles, K., Ashbolt, N., Ferguson, C., Roser, D., McGuinness, R., Deere, D., 2003. Centralised versus decentralised sewage systems: a comparison of pathogen and nutrient loads released into Sydney's drinking water catchments. *Water Sci. Technol.* 48, 53-60.
- Chauret, C., Springthorpe, S., Sattar, S., 1999. Fate of *Cryptosporidium* oocysts, *Giardia* cysts, and microbial indicators during wastewater treatment and anaerobic sludge digestion. *Canadian Journal of Microbiology* 45, 257-262.
- Chauret, C., Armstrong, N., Fisher, J., Sharma, R., Springthorpe, S., Sattar, S., 1995. Correlating *Cryptosporidium* and *Giardia* with microbial indicators. *Journal of the American Water Works Association* 87, 76-84.
- Cheng, H., Lucy, F., Graczyk, T., Broaders, M., Tamang, L., Connolly, M., 2009. Fate of *Cryptosporidium parvum* and *Cryptosporidium hominis* oocysts and *Giardia duodenalis* cysts during secondary wastewater treatments. *Parasitology research* 105, 689-696.

- Choi, M., Hong, S., Chai, J., Park, W., Yu, J., 2004. In vitro culture of *Cryptosporidium* muris in a human stomach adenocarcinoma cell line. The Korean Journal of Parasitology 42, 27.
- Cinque, K., Jayasuriya, N., 2010. Catchment process affecting drinking water quality, including the significance of rainfall events, using factor analysis and event mean concentrations. Journal of Water and Health 8, 751-763.
- Cinque, K., 2009. A quantitative approach to assessing the effectiveness of catchment management for the improvement of drinking water quality (Thesis). RMIT University, School of Civil Environmental and Chemical Engineering, Melbourne, Australia, p. 329.
- Clancy, J.L., Marshall, M.M., Hargy, T.M., Korich, D.G., 2004. Susceptibility of five strains of *Cryptosporidium* parvum oocysts to UV light. Journal of the American Water Works Association 96, 84-93.
- Coklin, T., Farber, J., Parrington, L., Dixon, B., 2007. Prevalence and molecular characterization of *Giardia duodenalis* and *Cryptosporidium* spp. in dairy cattle in Ontario, Canada. Veterinary Parasitology 150, 297-305.
- Compagnon, B., Petzoldt, H., Ferveur, E., Caquelin, P., Hambsch, B., de Roubin, M.-R., 1999. Enhanced recovery and detection of *Cryptosporidium* oocysts and *Giardia* cysts in surface water samples by flocculation, American Water Works Association-Water Quality Technology Conference Tampa, Florida, USA, p. 11.
- Connell, K., Rodgers, C.C., Shank-Givens, H.L., Scheller, J., Pope, M.L., Miller, K., 2000. Building a better protozoa data set. Journal of the American Water Works Association 92, 30-43.
- Côté, C., Villeneuve, A., Lessard, L., Quessy, S., 2006. Fate of pathogenic and nonpathogenic microorganisms during storage of liquid hog manure in Québec. Livestock Science 102, 204-210.
- Craun, G.F., Brunkard, J.M., Yoder, J.S., Roberts, V.A., Carpenter, J., Wade, T., Calderon, R.L., Roberts, J.M., Beach, M.J., Roy, S.L., 2010. Causes of outbreaks associated with drinking water in the United States from 1971 to 2006. Clinical Microbiology Reviews 23, 507-528.
- Craun, M.F., Craun, G.F., Calderon, R.L., Beach, M.J., 2006. Waterborne outbreaks reported in the United States. Journal of Water and Health 4, 19-30.

- Craun, G.F., Hubbs, S.A., Frost, F., Calderon, R.L., Via, S.H., 1998. Waterborne outbreaks of *Cryptosporidiosis*. *Journal of the American Water Works Association* 90, 81-91.
- Crockett, C.S., 2007. The role of wastewater treatment in protecting water supplies against emerging pathogens. *Water Environment Research* 79, 221-232.
- Davies-Colley, R., Donnison, A., Speed, D., Ross, C., Nagels, J., 1999. Inactivation of faecal indicator micro-organisms in waste stabilisation ponds: interactions of environmental factors with sunlight. *Water research* 33, 1220-1230.
- Davies, C.M., Kaucner, C., Deere, D., Ashbolt, N.J., 2003. Recovery and enumeration of *Cryptosporidium* parvum from animal fecal matrices. *Applied and Environmental Microbiology* 69, 2842-2847.
- Dechesne, M., Soyeux, E., Loret, J.F., Westrell, T., Stenström, T.A., Gornik, V., Koch, C., Exner, M., Stanger, M., Agutter, P., Lake, R., Roser, D., Ashbolt, N., Dullemon, Y., Hijnen, W., Medema, G.J., 2006. Pathogens in source water (preliminary web version). *Microrisk*, p. 44.
- Deere, D., Vesey, G., Milner, M., Williams, K., Ashbolt, N., Veal, D., 1998. Rapid method for fluorescent in situ ribosomal RNA labelling of *Cryptosporidium* parvum. *Applied and Environmental Microbiology* 85, 807-818.
- Desjardins, R., 1997. *Le traitement des eaux*, 2e édition revue et améliorée, 2e ed. Édition de l'École Polytechnique de Montréal, Montréal, Québec, Canada.
- Di Giovanni, G.D., LeChevallier, M.W., 2005. Quantitative-PCR assessment of *Cryptosporidium* parvum cell culture infection. *Applied and Environmental Microbiology* 71, 1495-1500.
- Di Giovanni, G.D., Hashemi, F.H., Shaw, N.J., Abrams, F.A., LeChevallier, M.W., Abbaszadegan, M., 1999. Detection of infectious *Cryptosporidium* parvum oocysts in surface and filter backwash water samples by immunomagnetic separation and integrated cell culture-PCR. *Applied and Environmental Microbiology* 65, 3427-3432.
- DiGiorgio, C.L., Gonzalez, D.A., Huitt, C.C., 2002. *Cryptosporidium* and *Giardia* recoveries in natural waters by using environmental protection agency method 1623. *Applied and Environmental Microbiology* 68, 5952-5955.

- Dorner, S.M., Huck, P.M., Slawson, R.M., 2004. Estimating potential environmental loadings of *Cryptosporidium* spp. and *Campylobacter* spp. from livestock in the Grand River Watershed, Ontario, Canada. *Environmental Science and Technology* 38, 3370-3380.
- Drinking Water Inspectorate (DWI), 2000. Standard operating protocol for the monitoring of *Cryptosporidium* oocysts in treated water supplies to satisfy water supply (water quality) (amendment) regulations 1999, SI No. 1524. Part 2 - Laboratory and analytical procedures, London, United Kingdom, p. 37.
- Drinking Water Inspectorate (DWI), 2005. Standard operating protocol for the monitoring of *Cryptosporidium* oocysts in treated water supplies to satisfy the water supply (water quality) regulations 2000, SI No. 3184 England, the water supply (water quality) regulations 2001, SI No. 3911 (W.323) Wales. Part 2 - Laboratory and Analytical Procedures.
- Dufour, A., Snozzi, M., Köster, W., Bartram, J., Ronchi, E., Fewtrell, L., 2003. Assessing microbial safety of drinking water: improving approaches and methods. World Health Organization - Drinking Water Quality Series, IWA Publishing, London, United Kingdom, p. 291.
- DuPont, H.L., Chappell, C.L., Sterling, C.R., Okhuysen, P.C., Rose, J.B., Jakubowski, W., 1995. The infectivity of *Cryptosporidium* parvum in healthy volunteers. *The New England Journal of Medicine* 332, 855-859.
- Environment Canada, 2010. <http://www.climate.weatheroffice.gc.ca>
- Fayer, R., Xiao, L., 2007. *Cryptosporidium* and Cryptosporidiosis (Second Edition). CRC Press, Taylor and Francis Group, Boca Ranton, Florida.
- Fayer, R., Gasbarre, L., Pasquali, P., Canals, A., Almeria, S., Zarlenga, D., 1998. *Cryptosporidium* parvum infection in bovine neonates: dynamic clinical, parasitic and immunologic patterns. *International Journal for Parasitology* 28, 49-56.
- Feachem, R., 1975. An improved role for faecal coliform to faecal streptococci ratios in the differentiation between human and non-human pollution sources. *Water research* 9, 689-690.
- Feng, H., Nie, W., Sheoran, A., Zhang, Q., Tzipori, S., 2006. Bile acids enhance invasiveness of *Cryptosporidium* spp. into cultured cells. *Infection and Immunity* 74, 3342-3346.

- Feng, Y.Y., Ong, S.L., Hu, J.Y., Song, L.F., Tan, X.L., Ng, W.J., 2003. Effect of particles on the recovery of *Cryptosporidium* oocysts from source water samples of various turbidities. *Applied and Environmental Microbiology* 69, 1898-1903.
- Ferguson, C.M., Croke, B.F.W., Norton, J.P., Haydon, S., Davies, C.M., Krogh, M.H., Ashbolt, N.J., 2010. Watershed pathogen modeling for risk management and load estimations. *Water Research Foundation*, p. 266.
- Ferguson, C., 2005. Deterministic models of microbial sources, fate and transport: a quantitative tool for pathogen catchment budgeting (Thesis). University of New South Wales, Sydney, Australia, p. 351.
- Ferguson, C., de Roda Husman, A.M., Altavilla, N., Deere, D., Ashbolt, N., 2003. Fate and transport of surface water pathogens in watersheds. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology* 33, 299-361.
- Ferguson, C.M., Coote, B.G., Ashbolt, N.J., Stevenson, I.M., 1996. Relationships between indicators, pathogens and water quality in an estuarine system. *Water Research* 30, 2045-2054.
- Finstein, M.S., 2004. Protecting watersheds from *Cryptosporidium* in manure: a literature review. *Journal of the American Water Works Association* 96, 114-116.
- Francy, D.S., Simmons, O.D., Ware, M.W., Granger, E.J., Sobsey, M.D., Schaefer, F.W., 2004. Effects of seeding procedures and water quality on recovery of *Cryptosporidium* oocysts from stream water by using us environmental protection agency method 1623. *Applied and Environmental Microbiology* 70, 4118-4128.
- Freire-Santos, F., Oteiza-Lopez, A.M., Vergara-Castiblanco, C.A., Ares-Mazas, E., 2000. Study of the combined influence of environmental factors on viability of *Cryptosporidium parvum* oocysts in water evaluated by fluorogenic vital dyes and excystation techniques. *Veterinary Parasitology* 89, 253-259.
- Fu, C.Y., Xie, X., Huang, J.J., Zhang, T., Wu, Q.Y., Chen, J.N., Hu, H.Y., 2010. Monitoring and evaluation of removal of pathogens at municipal wastewater treatment plants. *Water Sci. Technol.* 61, 1589-1599.
- Gannon, J.J., Busse, M.K., 1989. *E. coli* and enterococci levels in urban stormwater, river water and chlorinated treatment-plant effluent. *Water Research* 23, 1167-1176.

- Garcés, G., Effenberger, M., Najdrowski, M., Wackwitz, C., Gronauer, A., Wilderer, P.A., Lebuhn, M., 2006. Quantification of *Cryptosporidium* parvum in anaerobic digesters treating manure by (reverse-transcription) quantitative real-time PCR, infectivity and excystation tests. *Water Sci. Technol.* 53, 195-202.
- Gehr, R., Wagner, M., Veerasubramanian, P., Payment, P., 2003. Disinfection efficiency of peracetic acid, UV and ozone after enhanced primary treatment of municipal wastewater. *Water Research* 37, 4573-4586.
- Geldreich, E., 1966. Sanitary significance of fecal coliforms in the environment. Federal Water Pollut Contr Admin Publication WP-20-3, Washington, DC. 1966. 122 p, 4 fig, 35 tab, 153 ref.
- Gennaccaro, A.L., McLaughlin, M.R., Quintero-Betancourt, W., Huffman, D.E., Rose, J.B., 2003. Infectious *Cryptosporidium* parvum oocysts in final reclaimed effluent. *Applied and Environmental Microbiology* 69, 4983-4984.
- Gibson III, C.J., Stadterman, K.L., States, S., Sykora, J., 1998. Combined sewer overflows: a source of *Cryptosporidium* and *Giardia*? *Water Sci. Technol.* 38, 67-72.
- Gold, D., Stein, B., Tzipori, S., 2001. The utilization of sodium taurocholate in excystation of *Cryptosporidium* parvum and infection of tissue culture. *The Journal of Parasitology* 87, 997-1000.
- Graczyk, T.K., Girouard, A.S., Tamang, L., Nappier, S.P., Schwab, K.J., 2006. Recovery, bioaccumulation, and inactivation of human waterborne pathogens by the Chesapeake Bay nonnative oyster, *Crassostrea ariakensis*. *Applied and Environmental Microbiology* 72, 3390-3395.
- Graczyk, T.K., Marcogliese, D.J., de Lafontaine, Y., Da Silva, A.J., Mhangami-Ruwende, B., Pieniazek, N.J., 2001. *Cryptosporidium* parvum oocysts in zebra mussels (*Dreissena polymorpha*): evidence from the St. Lawrence River. *Parasitology Research* 87, 231-234.
- Graczyk, T.K., Fayer, R., Trout, J.M., Lewis, E.J., Farley, C.A., Sulaiman, I., Lal, A.A., 1998. *Giardia* sp. cysts and infectious *Cryptosporidium* parvum oocysts in the feces of migratory Canada Geese (*Branta canadensis*). *Applied and Environmental Microbiology* 64, 2736-2738.

- Haas, C.N., Rose, J.B., Gerba, C.P., 1999. Quantitative microbial risk assessment. John Wiley and Sons, Inc., New York, USA.
- Hallier-Soulier, S., Guillot, E., 2003. An immunomagnetic separation-reverse transcription polymerase chain reaction (IMS-RT-PCR) test for sensitive and rapid detection of viable waterborne *Cryptosporidium parvum*. *Environmental Microbiology* 5, 592-598.
- Harwood, V.J., Levine, A.D., Scott, T.M., Chivukula, V., Lukasik, J., Farrah, S.R., Rose, J.B., 2005. Validity of the indicator organism paradigm for pathogen reduction in reclaimed water and public health protection. *Applied and Environmental Microbiology* 71, 3163-3170.
- Haydon, S.R., 2006. A simplified process-based model for predicting pathogen transport in catchments. Monash University, Melbourne, Australia.
- Heitman, T.L., Frederick, L.M., Viste, J.R., Guselle, N.J., Morgan, U.M., Thompson, R.C.A., Olson, M.E., 2002. Prevalence of *Giardia* and *Cryptosporidium* and characterization of *Cryptosporidium* spp. isolated from wildlife, human, and agricultural sources in the North Saskatchewan River Basin in Alberta, Canada. *Canadian Journal of Microbiology* 48, 530-541.
- Hemphill, A., Mueller, J., Esposito, M., 2006. Nitazoxanide, a broad-spectrum thiazolide anti-infective agent for the treatment of gastrointestinal infections. *Expert Opinion on Pharmacotherapy* 7, 953-964.
- Hijjawi, N.S., Meloni, B.P., Ng'anzo, M., Ryan, U.M., Olson, M.E., Cox, P.T., Monis, P.T., Thompson, R.C.A., 2004. Complete development of *Cryptosporidium parvum* in host cell-free culture. *International Journal for Parasitology* 34, 769-777.
- Huetink, R.E.C., van der Giessen, J.W.B., Noordhuizen, J.P.T.M., Ploeger, H.W., 2001. Epidemiology of *Cryptosporidium* spp. and *Giardia duodenalis* on a dairy farm. *Veterinary Parasitology* 102, 53-67.
- Huffman, D.E., Gennaccaro, A.L., Berg, T.L., Batzer, G., Widmer, G., 2006. Detection of infectious parasites in reclaimed water. *Water Environment Research* 78, 2297-2302.
- Huffman, D.E., Coulliette, A., Slifko, T., Rose, J.B., 2004. Impact of sample collection and processing on the infectivity of *Cryptosporidium*. American Water Works Association Research Foundation, Denver, Colorado, USA, p. 90.

- Isaac-Renton, J., Li, A., Shay, S., Ong, C.S., Fyfe, M., Khan, M., Ruecker, N., Neumann, N., 2005. Watershed management and drinking water quality: preliminary studies in two canadian provinces, American Water Works Association-Annual Conference San Francisco, California.
- Ives, R.L., Kamarainen, A.M., John, D.E., Rose, J.B., 2007. Use of cell culture to assess *Cryptosporidium parvum* survival rates in natural groundwaters and surface waters. *Applied and Environmental Microbiology* 73, 5968-5970.
- Jaidi, K., Barbeau, B., Carrière, A., Desjardins, R., Prévost, M., 2009. Including operational data in QMRA model: development and impact of model inputs. *Journal of Water and Health* 7, 77-95.
- Jameson, P., Hung, Y., DEE, P., Kuo, C., Bosela, P., 2008. *Cryptosporidium* Outbreak (Water Treatment Failure): North Battleford, Saskatchewan, Spring 2001. *Journal of Performance of Constructed Facilities* 22, 342.
- Jenkins, M.C., Trout, J., Abrahamsen, M.S., Lancto, C.A., Higgins, J., Fayer, R., 2000. Estimating viability of *Cryptosporidium parvum* oocysts using reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR) directed at mRNA encoding amyloglucosidase. *Journal of Microbiological Methods* 43, 97-106.
- Jenkins, M., Walker, M., Bowman, D., Anthony, L., Ghiorse, W., 1999. Use of a sentinel system for field measurements of *Cryptosporidium parvum* oocyst inactivation in soil and animal waste. *Applied and environmental microbiology* 65, 1998.
- Jiang, J., Alderisio, K.A., Singh, A., Xiao, L., 2005a. Development of procedures for direct extraction of *Cryptosporidium* DNA from water concentrates and for relief of PCR inhibitors. *Applied and Environmental Microbiology* 71, 1135-1141.
- Jiang, J., Alderisio, K.A., Xiao, L., 2005b. Distribution of *Cryptosporidium* genotypes in storm event water samples from three watersheds in New York. *Applied and Environmental Microbiology* 71, 4446-4454.
- Johnson, A.M., Rochelle, P.A., Di Giovanni, G.D., 2010. Detection of infectious *Cryptosporidium* in conventionally treated drinking water. Water Research Foundation, Denver, Colorado, USA, p. 130.



- Johnson, A., Di Giovanni, G., Rochelle, P., 2007. Detection of infection *Cryptosporidium* in treated drinking water using multiple cell culture assays and genotyping, American Water Works Association-Water Quality Technology Conference Charlotte, North Carolina, USA.
- Johnson, A.M., Linden, K., Ciociola, K.M., DeLeon, R., Widmer, G., Rochelle, P.A., 2005. UV inactivation of *Cryptosporidium* hominis as measured in cell culture. *Applied and Environmental Microbiology* 71, 2800-2802.
- Karanis, P., Kourenti, C., Smith, H., 2007. Waterborne transmission of protozoan parasites: a worldwide review of outbreaks and lessons learnt. *Journal of Water and Health* 5, 1-38.
- Kato, S., Jenkins, M.B., Ghiorse, W.C., Bowman, D.D., 2001. Chemical and physical factors affecting the excystation of *Cryptosporidium* parvum oocysts. *The Journal of Parasitology* 87, 575-581.
- Kiang, K.M., Scheftel, J.M., Leano, F.T., Taylor, C.M., Belle-Isle, P.A., Cebelinski, E.A., Danila, R., Smith, K.E., 2006. Recurrent outbreaks of cryptosporidiosis associated with calves among students at an educational farm programme, Minnesota, 2003. *Epidemiol. Infect.* 134, 878-886.
- King, B.J., Keegan, A.R., Monis, P.T., Saint, C.P., 2005. Environmental temperature controls *Cryptosporidium* oocyst metabolic rate and associated retention of infectivity. *Applied and Environmental Microbiology* 71, 3848-3857.
- King, B.J., Monis, P.T., 2007. Critical processes affecting *Cryptosporidium* oocyst survival in the environment. *Parasitology* 134, 309-323.
- Kistemann, T., Classen, T., Koch, C., Dangendorf, F., Fischeder, R., Gebel, J., Vacata, V., Exner, M., 2002. Microbial load of drinking water reservoir tributaries during extreme rainfall and runoff. *Applied and Environmental Microbiology* 68, 2188-2197.
- Korich, D.G., Mead, J.R., Madore, M.S., Sinclair, N.A., Sterling, C.R., 1990. Effects of ozone, chlorine dioxide, chlorine, and monochloramine on *Cryptosporidium* parvum oocyst viability. *Applied and Environmental Microbiology* 56, 1423-1428.
- Kuczynska, E., Shelton, D., Pachepsky, Y., 2005. Effect of bovine manure on *Cryptosporidium* parvum oocyst attachment to soil. *Applied and environmental microbiology* 71, 6394.

- Kuhn, R.C., Rock, C.M., Oshima, K.H., 2002. Effects of pH and magnetic material on immunomagnetic separation of *Cryptosporidium* oocysts from concentrated water samples. *Applied and Environmental Microbiology* 68, 2066-2070.
- Labbé, N., Lalancette, C., Papineau, I., Prévost, M., Barbeau, B., 2007. Analyse des risques microbiologiques associés aux décanteurs à lits de boues, 19e Atelier sur l'Eau Potable, Réseau Environnement, St-Hyacinthe, Québec, Canada.
- Lake, I.R., Nichols, G., Bentham, G., Harrison, F.C.D., Hunter, P.R., Kovats, R.S., 2007. Cryptosporidiosis decline after regulation, England and Wales, 1989-2005. *Emerging Infectious Diseases* 13, 623-625.
- Lalancette, C., Di Giovanni, G.D., Prévost, M., 2010. Improved risk analysis by dual direct detection of total and infectious *Cryptosporidium* oocysts on cell culture in combination with immunofluorescent assay. *Applied and Environmental Microbiology* 76, 566-577.
- Laupland, K.B., Church, D.L., 2005. Population-based laboratory surveillance for *Giardia* sp. and *Cryptosporidium* sp. infections in a large Canadian health region. *BMC Infectious Diseases* 5, 1-9.
- LeChevallier, M.W., Au, K.-K., 2004. Water treatment and pathogen control: process efficiency in achieving safe drinking water. World Health Organization and International Water Association Publishing, London, United Kingdom.
- LeChevallier, M.W., Di Giovanni, G.D., Clancy, J.L., Bukhari, Z., Bukhari, S., Rosen, J.S., Sobrinho, J., Frey, M.M., 2003. Comparison of method 1623 and cell culture-PCR for detection of *Cryptosporidium* spp. in source waters. *Applied and Environmental Microbiology* 69, 971-979.
- LeChevallier, M.W., Norton, W.D., Lee, R.G., 1991. Occurrence of *Giardia* and *Cryptosporidium* spp. in surface water supplies. *Applied and Environmental Microbiology* 57, 2610-2616.
- Lemarchand, K., Lebaron, P., 2003. Occurrence of *Salmonella* spp. and *Cryptosporidium* spp. in a French coastal watershed: relationship with fecal indicators. *Fems Microbiology Letters* 218, 203-209.
- Lemos, V., Graczyk, T.K., Alves, M., Lobo, M.L., Sousa, M.C., Antunes, F., Matos, O., 2005. Identification and determination of the viability of *Giardia lamblia* cysts and *Cryptosporidium parvum* and *Cryptosporidium hominis* oocysts in human fecal and water

- supply samples by fluorescent in situ hybridization (FISH) and monoclonal antibodies. *Parasitology Research* 98, 48-53.
- Lévesque, B., Gagnon, F., Valentin, A., Cartier, J.-F., Chevalier, P., Cardinal, P., Cantin, P., Gingras, S., 2006. Étude de la contamination microbienne des myes (*Mya arenaria*) de la rive nord de l'estuaire maritime du fleuve Saint-Laurent (Québec, Canada). *Canadian Journal of Microbiology* 52, 984-991.
- Li, X., Atwill, E., Dunbar, L., Jones, T., Hook, J., Tate, K., 2005. Seasonal temperature fluctuations induces rapid inactivation of *Cryptosporidium* parvum. *Environ. Sci. Technol* 39, 4484-4489.
- Li, H., Gyurek, L.L., Finch, G.R., Smith, D.W., Belosevic, M., 2001. Effect of temperature on ozone inactivation of *Cryptosporidium* parvum in oxidant demand-free phosphate buffer. *Journal of Environmental Engineering* 127, 456-467.
- Limor, J.R., Lal, A.A., Xiao, L., 2002. Detection and differentiation of *Cryptosporidium* parasites that are pathogenic for humans by real-time PCR. *Journal of Clinical Microbiology* 40, 2335-2338.
- Lindsay, D.S., Woods, K.M., Upton, S.J., Blagburn, B.L., 2000. Activity of decoquinate against *Cryptosporidium* parvum in cell cultures and neonatal mice. *Veterinary Parasitology* 89, 307-311.
- Liu, L., Phanikumar, M., Molloy, S., Whitman, R., Shively, D., Nevers, M., Schwab, D., Rose, J., 2006. Modeling the transport and inactivation of *E. coli* and enterococci in the near-shore region of Lake Michigan. *Environ. Sci. Technol* 40, 5022-5028.
- Llorente, M.T., Clavel, A., Goni, M.P., Varea, M., Seral, C., Becerril, R., Suarez, L., Gomez-Lus, R., 2007. Genetic characterization of *Cryptosporidium* species from humans in Spain. *Parasitology International* 56, 201-205.
- Mac Kenzie, W.R., Hoxie, N.J., Proctor, M.E., Gradus, M.S., Blair, K.A., Peterson, D.E., Kazmierczak, J.J., Addiss, D.G., Fox, K.R., Rose, J.B., Davis, J.P., 1994. A massive outbreak in Milwaukee of *Cryptosporidium* infection transmitted through the public water supply. *The New England Journal of Medicine* 331, 161-167.

- Maddox-Hyttel, C., Langkjaer, R.B., Enemark, H.L., Vigre, H., 2006. *Cryptosporidium* and *Giardia* in different age groups of Danish cattle and pigs - Occurrence and management associated risk factors. *Veterinary Parasitology* 141, 48-59.
- Mawdsley, J.L., Brooks, A.E., Merry, R.J., 1996. Movement of the protozoan pathogen *Cryptosporidium* parvum through three contrasting soil types. *Biology and Fertility of Soils* 21, 30-36.
- McCuin, R.M., Clancy, J.L., 2005. Methods for the recovery, isolation and detection of *Cryptosporidium* oocysts in wastewaters. *Journal of Microbiological Methods* 63, 73-88.
- McCuin, R.M., Clancy, J.L., 2006. Occurrence of *Cryptosporidium* oocysts in US wastewaters. *Journal of Water and Health* 4, 437-452.
- McGuire, M.J., McLain, J.L., Obolensky, A., 2002. Information collection rule data analysis. American Water Works Association and United States Environmental Protection Agency, Washington, DC, USA, p. 600.
- McLauchlin, J., Amar, C., Pedraza-Diaz, S., Nichols, G.L., 2000. Molecular epidemiological analysis of *Cryptosporidium* spp. in the United Kingdom: results of genotyping *Cryptosporidium* spp. in 1,705 fecal samples from humans and 105 fecal samples from livestock animals. *Journal of Clinical Microbiology* 38, 3984-3990.
- Medema, G.J., Shaw, S., Waite, M., Snozzi, M., Morreau, A., Grabow, W., 2003. Catchment characterisation and source water quality (Chapter 4). World Health Organization and the Organisation for Economic Co-operation and Development by IWA Publishing, London, United Kingdom, pp. 111-158.
- Medema, G.J., Schijven, J.F., 2001. Modelling the sewage discharge and dispersion of *Cryptosporidium* and *Giardia* in surface water. *Water Research* 35, 4307-4316.
- Medema, G.J., Schets, F.M., Teunis, P.F.M., Havelaar, A.H., 1998. Sedimentation of free and attached *Cryptosporidium* oocysts and *Giardia* cysts in water. *Applied and Environmental Microbiology* 64, 4460-4466.
- Medema, G.J., Bahar, M., Schets, F.M., 1997. Survival of *Cryptosporidium* parvum, *Escherichia coli*, faecal enterococci and *Clostridium perfringens* in river water: influence of temperature and autochthonous microorganisms. *Water Sci. Technol.* 35, 249-252.

- Mele, R., Gomez, M.M., Tosini, F., Pozio, E., 2003. Detection and counting of *Cryptosporidium* parvum in HCT-8 cells by flowcytometry. *Parasite* 10, 297-302.
- Mendonca, C., Almeida, A., Castro, A., Delgado, M.D., Soares, S., da Costa, J.M.C., Canada, N., 2007. Molecular characterization of *Cryptosporidium* and *Giardia* isolates from cattle from Portugal. *Veterinary Parasitology* 147, 47-50.
- Messner, M.J., Wolpert, R.L., 2002. *Cryptosporidium* and *Giardia* occurrence in ICR drinking sources - statistical analyses of ICR data (Chapter 19). American Water Works Association Research Foundation and United States Environmental Protection Agency, Washington, DC, USA, pp. 463-486.
- Michaud, A.R., Lauzier, R., Laverdière, M.R., 2005. Mobilité du phosphore et intervention agroenvironnementale en bassin versant agricole: étude de cas du ruisseau au Castor, tributaire de la rivière Aux Brochets, Québec. *Agrosol* 16, 47-60.
- Ministère du Développement Durable de l'Environnement et des Parcs (MDDEP), 2009. ([http://www.cehq.gouv.qc.ca/depot/historique\\_donnees/fichier/030422\\_Q.txt](http://www.cehq.gouv.qc.ca/depot/historique_donnees/fichier/030422_Q.txt)).
- Ministère du Développement Durable de l'Environnement et des Parcs (MDDEP), 2006. Guide de conception des installations de protection d'eau potable (Volume 1). Gouvernement du Québec, Canada, p. 286.
- Ministère du Développement Durable de l'Environnement et des Parcs du Québec (MDDEP), 2005. Règlement sur la qualité de l'eau potable (dernière version disponible). Gouvernement du Québec, Canada, p. 27.
- Monis, P.T., Giglio, S., 2006. Nucleic acid amplification-based techniques for pathogen detection and identification. *Infection, Genetics and Evolution* 6, 2-12.
- Monis, P.T., Giglio, S., Keegan, A.R., Thompson, R.C.A., 2005. Emerging technologies for the detection and genetic characterization of protozoan parasites. *Trends in Parasitology* 21, 340-346.
- Montemayor, M., Valero, F., Jofre, J., Lucena, F., 2005. Occurrence of *Cryptosporidium* spp. oocysts in raw and treated sewage and river water in North-Eastern Spain. *Journal of Applied Microbiology* 99, 1455-1462.

- Morgan, U., Xiao, L., Hill, B., O'Donoghue, P., Limor, J., Lal, A., Thompson, R., 2000. Detection of the *Cryptosporidium parvum* "human" genotype in a dugong (*Dugong dugon*). *The Journal of parasitology* 86, 1352-1354.
- Morgan-Ryan, U.M., Fall, A., Ward, L.A., Hijjawi, N., Sulaiman, I., Fayer, R., Thompson, R.C., Olson, M., Lal, A., Xiao, L., 2002. *Cryptosporidium hominis* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) from *Homo sapiens*. *The Journal of Eukaryotic Microbiology* 49, 433-440.
- Mosier, D.A., Oberst, R.D., 2000. Cryptosporidiosis. A global challenge. *Annals of the New York Academy of Sciences* 916, 102-111.
- Moulton-Hancock, C., Rose, J.B., Vasconcelos, G.J., Harris, S.I., Klonicki, P.T., Sturbaum, G.D., 2000. *Giardia* and *Cryptosporidium* occurrence in groundwater. *Journal of the American Water Works Association* 92, 117-123.
- Neira-Munoz, E., Okoro, C., McCarthy, N.D., 2007. Outbreak of waterborne cryptosporidiosis associated with low oocyst concentrations. *Epidemiol. Infect.* 135, 1159-1164.
- Nichols, R.A.B., Campbell, B.M., Smith, H.V., 2006. Molecular fingerprinting of *Cryptosporidium* oocysts isolated during water monitoring. *Applied and Environmental Microbiology* 72, 5428-5435.
- Nieminski, E., Durrant, G.C., Hoyt, M.B., Owens, M.E., Peterson, L., Peterson, S., Tanner, W.D., Rosen, J., Clancy, J.L., 2010. Is *E. coli* an appropriate surrogate for *Cryptosporidium* occurrence in water? *Journal of the American Water Works Association* 102, 65-78.
- O'Handley, R.M., Olson, M.E., Fraser, D., Adams, P., Thompson, R.C.A., 2000. Prevalence and genotypic characterisation of *Giardia* in dairy calves from Western Australia and Western Canada. *Veterinary Parasitology* 90, 193-200.
- Odoi, A., Martin, S.W., Michel, P., Holt, J., Middleton, D., Wilson, J., 2004. Determinants of the geographical distribution of endemic giardiasis in Ontario, Canada: a spatial modelling approach. *Epidemiol. Infect.* 132, 967-976.
- Okhuysen, P.C., Chappell, C.L., Crabb, J.H., Sterling, C.R., DuPont, H.L., 1999. Virulence of three distinct *Cryptosporidium parvum* isolates for healthy adults. *The Journal of Infectious Diseases* 180, 1275-1281.

- Olson, M.E., O'Handley, R.M., Ralston, B.J., McAllister, T.A., Thompson, R.C.A., 2004. Update on *Cryptosporidium* and *Giardia* infections in cattle. *Trends in Parasitology* 20, 185-191.
- Olson, M.E., Thorlakson, C.L., Deselliers, L., Morck, D.W., McAllister, T.A., 1997. *Giardia* and *Cryptosporidium* in Canadian farm animals. *Veterinary Parasitology* 68, 375-381.
- Ong, C., Moorehead, W., Ross, A., Isaac-Renton, J., 1996. Studies of *Giardia* spp. and *Cryptosporidium* spp. in two adjacent watersheds. *Applied and Environmental Microbiology* 62, 2798-2805.
- Ong, C.S., Eisler, D.L., Goh, S.H., Tomblin, J., Awad-El-Kariem, F.M., Beard, C.B., Xiao, L., Sulaiman, I., Lal, A., Fyfe, M., King, A., Bowie, W.R., Isaac-Renton, J.L., 1999. Molecular epidemiology of *Cryptosporidiosis* outbreaks and transmission in British Columbia, Canada. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 61, 63-69.
- Paranychianakis, N., Angelakis, A., Leverenz, H., Tchobanoglous, G., 2006. Treatment of wastewater with slow rate systems: A review of treatment processes and plant functions. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology* 36, 187-259.
- Passerat, J., Ouattara, N.K., Mouchel, J.-M., Vincent, R., Servais, P., 2010. Impact of an intense combined sewer overflow event on the microbiological water quality of the Seine River. *Water Research*.
- Payment, P., Locas, A., 2010. Pathogens in water: value and limits of correlation with microbial indicators. *Ground Water*, 1-8.
- Payment, P., 2003. Enlèvement des microorganismes pathogènes et des bactéries indicatrices par les stations de traitement des eaux usées municipales situées sur la rivière des Mille îles. Ministère de l'Environnement du Québec. Programme d'aide à la recherche et au développement en environnement (PARDE), p. 153.
- Payment, P., Plante, R., Cejka, P., 2001. Removal of indicator bacteria, human enteric viruses, *Giardia* cysts, and *Cryptosporidium* oocysts at a large wastewater primary treatment facility. *Canadian Journal of Microbiology* 47, 188-193.
- Payment, P., Berte, A., Prévost, M., Ménard, B., Barbeau, B., 2000. Occurrence of pathogenic microorganisms in the Saint Lawrence River (Canada) and comparison of health risks for populations using it as their source of drinking water. *Canadian Journal of Microbiology* 46, 565-576.

- Payment, P., Franco, E., 1993. *Clostridium perfringens* and somatic coliphages as indicators of the efficiency of drinking water treatment for viruses and protozoan cysts. *Applied and Environmental Microbiology* 59, 2418-2424.
- Payment, P., Berube, A., Perreault, D., Armon, R., Trudel, M., 1989. Concentration of *Giardia lamblia* cysts, *Legionella pneumophila*, *Clostridium perfringens*, human enteric viruses, and coliphages from large volumes of drinking water, using a single filtration. *Canadian Journal of Microbiology* 35, 932-925.
- Percival, S., Chalmers, R., Embrey, M., Hunter, P., Sellwood, J., Wyn-Jones, P., 2004. *Microbiology of waterborne diseases*. Elsevier Academic Press, San Diego, California, USA.
- Perz, J.F., Le Blancq, S.M., 2001. *Cryptosporidium parvum* infection involving novel genotypes in wildlife from lower New York State. *Applied and Environmental Microbiology* 67, 1154-1162.
- Petterson, S.R., Signor, R.S., Ashbolt, N.J., 2007. Incorporating method recovery uncertainties in stochastic estimates of raw water protozoan concentrations for QMRA. *Journal of Water and Health* 5, 51-65.
- Plutzer, J., Karanis, P., 2007. Genotype and subtype analyses of *Cryptosporidium* isolates from cattle in Hungary. *Veterinary Parasitology* 146, 357-362.
- Pokorny, N.J., Weir, S.C., Carreno, R.A., Trevors, J.T., Lee, H., 2002. Influence of temperature on *Cryptosporidium parvum* oocyst infectivity in river water samples as detected by tissue culture assay. *Journal of Parasitology* 88, 641-643.
- Pyke, G., Becker, W.C., Head, R., O'Melia, C.R., 2003. Impacts of major point and non-point sources on raw water treatability. American Water Works Association Research Foundation (AWWARF), Denver, Colorado, USA, p. 142.
- Quintero-Betancourt, W., Gennaccaro, A.L., Scott, T.M., Rose, J.B., 2003. Assessment of methods for detection of infectious *Cryptosporidium* oocysts and *Giardia* cysts in reclaimed effluents. *Applied and Environmental Microbiology* 69, 5380-5388.
- Ramirez, N.E., Wang, P., Lejeune, J., Shipitalo, M.J., Ward, L.A., Sreevatsan, S., Dick, W.A., 2009. Effect of tillage and rainfall on transport of manure-applied *Cryptosporidium parvum* oocysts through soil. *Journal of Environmental Quality* 38, 2394-2401.



- Ramirez, N.E., Ward, L.A., Sreevatsan, S., 2004. A review of the biology and epidemiology of cryptosporidiosis in humans and animals. *Microbes and infection* 6, 773-785.
- Rechenburg, A., Koch, C., Classen, T., Kistemann, T., 2006. Impact of sewage treatment plants and combined sewer overflow basins on the microbiological quality of surface water. *Water Sci. Technol.* 54, 95-99.
- Reinoso, R., Becares, E., 2008. The occurrence of intestinal parasites in swine slurry and their removal in activated sludge plants. *Bioresource technology* 99, 6661-6665.
- Reinoso, R., Torres, L., Becares, E., 2008. Efficiency of natural systems for removal of bacteria and pathogenic parasites from wastewater. *Science of the Total Environment* 395, 80-86.
- Robertson, L.J., Hermansen, L., Gjerde, B.K., 2006. Occurrence of *Cryptosporidium* oocysts and *Giardia* cysts in sewage in Norway. *Applied and Environmental Microbiology* 72, 5297-5303.
- Robertson, L.J., Paton, C.A., Campbell, A.T., Smith, P.G., Jackson, M.H., Gilmour, R.A., Black, S.E., Stevenson, D.A., Smith, H.V., 2000. *Giardia* cysts and *Cryptosporidium* oocysts at sewage treatment works in Scotland, UK. *Water research* 34, 2310-2322.
- Robertson, L.J., Campbell, A.T., Smith, H.V., 1992. Survival of *Cryptosporidium* parvum oocysts under various environmental pressures. *Applied and Environmental Microbiology* 58, 3494-3500.
- Rochelle, P.A., 2004. Applications of in-vitro cell culture for measuring infectivity and inactivation of *Cryptosporidium* parvum. *Water Science and Technology: Water Supply* 4, 87-92.
- Rochelle, P.A., Marshall, M.M., Mead, J.R., Johnson, A.M., Korich, D.G., Rosen, J.S., De Leon, R., 2002. Comparison of in vitro cell culture and a mouse assay for measuring infectivity of *Cryptosporidium* parvum. *Applied and Environmental Microbiology* 68, 3809-3817.
- Rochelle, P.A., De Leon, R., Johnson, A., Stewart, M.H., Wolfe, R.L., 1999. Evaluation of immunomagnetic separation for recovery of infectious *Cryptosporidium* parvum oocysts from environmental samples. *Applied and Environmental Microbiology* 65, 841-845.
- Rose, J.B., Farrah, S.R., Harwood, V.J., Levine, A.D., Lukasik, J., Menendez, P., Scott, T.M., 2004. Reduction of pathogens, indicator bacteria, and alternative indicators by wastewater treatment and reclamation processes. *Water Environment Research Foundation*, p. 90.

- Rossignol, J.-F., Kabil, S.M., El-Gohary, Y., Younis, A.M., 2006. Effect of nitazoxanide in diarrhea and enteritis caused by *Cryptosporidium* species. *Clinical Gastroenterology and Hepatology* 4, 320-324.
- Ruecker, N.J., Braithwaite, S.L., Topp, E., Edge, T., Lapen, D.R., Wilkes, G., Robertson, W., Medeiros, D., Sensen, C.W., Neumann, N.F., 2007. Tracking host sources of *Cryptosporidium* spp. in raw water for improved health risk assessment. *Applied and Environmental Microbiology* 73, 3945-3957.
- Ruecker, N.J., Bounsombath, N., Wallis, P., Ong, C.S.L., Isaac-Renton, J.L., Neumann, N.F., 2005. Molecular forensic profiling of *Cryptosporidium* species and genotypes in raw water. *Applied and Environmental Microbiology* 71, 8991-8994.
- Ruest, N., Faubert, G.M., Couture, Y., 1998. Prevalence and geographical distribution of *Giardia* spp. and *Cryptosporidium* spp. in dairy farms in Quebec. *The Canadian Veterinary Journal* 39, 697-700.
- Ryan, U., O'Hara, A., Xiao, L., 2004. Molecular and biological characterization of a *Cryptosporidium* molnari-like isolate from a guppy (*Poecilia reticulata*). *Applied and environmental microbiology* 70, 3761.
- Santin, M., Trout, J.M., Xiao, L.H., Zhou, L., Greiner, E., Fayer, R., 2004. Prevalence and age-related variation of *Cryptosporidium* species and genotypes in dairy calves. *Veterinary Parasitology* 122, 103-117.
- Schets, F.M., van Wijnen, J.H., Schijven, J.F., Schoon, H., de Roda Husman, A.M., 2008. Monitoring of waterborne pathogens in surface waters in amsterdam, the Netherlands, and the potential health risk associated with exposure to *Cryptosporidium* and giardia in these waters. *Applied and Environmental Microbiology* 74, 2069-2078.
- Schets, F.M., Engels, G.B., During, M., de Roda Husman, A.M., 2005. Detection of infectious *Cryptosporidium* oocysts by cell culture immunofluorescence assay: applicability to environmental samples. *Applied and Environmental Microbiology* 71, 6793-6798.
- Searcy, K.E., Packman, A.I., Atwill, E.R., Harter, T., 2006. Deposition of *Cryptosporidium* oocysts in streambeds. *Applied and Environmental Microbiology* 72, 1810-1816.

- Shepherd, K.M., Wyn-Jones, A.P., 1996. An evaluation of methods for the simultaneous detection of *Cryptosporidium* oocysts and *Giardia* cysts from water. *Applied and Environmental Microbiology* 62, 1317-1322.
- Simmons III, O.D., Sobsey, M.D., Heaney, C.D., Schaefer III, F.W., Francy, D.S., 2001. Concentration and detection of *Cryptosporidium* oocysts in surface water samples by method 1622 using ultrafiltration and capsule filtration. *Applied and Environmental Microbiology* 67, 1123-1127.
- Sipos, T., Merkel, J.R., 1970. An effect of calcium ions on the activity, heat stability, and structure of trypsin. *Biochemistry* 9, 2766-2775.
- Sischo, W.M., Atwill, E.R., Lanyon, L.E., George, J., 2000. Cryptosporidia on dairy farms and the role these farms may have in contaminating surface water supplies in the northeastern United States. *Preventive Veterinary Medicine* 43, 253-267.
- Slifko, T.R., Huffman, D.E., Dussert, B., Owens, J.H., Jakubowski, W., Haas, C.N., Rose, J.B., 2002. Comparison of tissue culture and animal models for assessment of *Cryptosporidium* parvum infection. *Experimental Parasitology* 101, 97-106.
- Slifko, T.R., Huffman, D.E., Rose, J.B., 1999. A most-probable-number assay for enumeration of infectious *Cryptosporidium* parvum oocysts. *Applied and Environmental Microbiology* 65, 3936-3941.
- Slifko, T.R., Friedman, D., Rose, J.B., Jakubowski, W., 1997. An in vitro method for detecting infectious *Cryptosporidium* oocysts with cell culture. *Applied and Environmental Microbiology* 63, 3669-3675.
- Smeets, P.W.M.H., van Dijk, J.C., Stanfield, G., Rietveld, L.C., Medema, G.J., 2007. How can the UK statutory *Cryptosporidium* monitoring be used for quantitative risk assessment of *Cryptosporidium* in drinking water? *Journal of Water and Health* 5, 107-118.
- Smith, A., Reacher M., Smerdon W., Adak G.K., Nichols G., and Chalmers R.M., 2006. Outbreaks of Waterborne Infectious Intestinal Disease in England and Wales, 1992-2003. *Epidemiology and Infection* 134, 1141-1149.
- Smith, H.V., Nichols, R.A.B., Grimason, A.M., 2005. *Cryptosporidium* excystation and invasion: getting to the guts of the matter. *Trends in Parasitology* 21, 133-142.

- Stanfield, G., Carrington, E., Albinet, F., Compagnon, B., Dumoutier, N., Hambsch, B., Lorthioy, A., Medema, G., Pezoldt, H., de Roubin, M.-R., de Lohman, A., Whitmore, T., 2000. An optimised and standardised test to determine the presence of the protozoa *Cryptosporidium* and *Giardia* in water. *Water Sci. Technol.* 41, 103-110.
- Starkey, S.R., White, M.E., Mohammed, H.O., 2007. *Cryptosporidium* and dairy cattle in the Catskill/Delaware watershed: a quantitative risk assessment. *Risk Analysis* 27, 1469-1485.
- Starkey, S.R., Wade, S.E., Schaaf, S., Mohammed, H.O., 2005. Incidence of *Cryptosporidium parvum* in the dairy cattle population in a New York City Watershed. *Veterinary Parasitology* 131, 197-205.
- States, S., Stadterman, K., Ammon, L., Vogel, P., Baldizar, J., Wright, D., Conley, L., Sykora, J., 1997. Protozoa in river water: sources, occurrence, and treatment. *Journal of the American Water Works Association* 89, 74-83.
- Sturbaum, G.D., Klonicki, P.T., Marshall, M.M., Jost, B.H., Clay, B.L., Sterling, C.R., 2002. Immunomagnetic separation (IMS)-fluorescent antibody detection and IMS-PCR detection of seeded *Cryptosporidium parvum* oocysts in natural waters and their limitations. *Applied and Environmental Microbiology* 68, 2991-2996.
- Sunderland, D., Graczyk, T., Tamang, L., Breysse, P., 2007. Impact of bathers on levels of *Cryptosporidium parvum* oocysts and *Giardia lamblia* cysts in recreational beach waters. *Water research* 41, 3483-3489.
- Tallon, P., Magajna, B., Lofranco, C., Leung, K.T., 2005. Microbial indicators of faecal contamination in water: a current perspective. *Water, Air and Soil Pollution* 166, 139-166.
- Tate, K.W., Pereira, M.D.G.C., Atwill, E.R., 2004. Efficacy of vegetated buffer strips for retaining *Cryptosporidium parvum*. *Journal of Environmental Quality* 33, 2243-2251.
- Thompson, R.C.A., 2004. The zoonotic significance and molecular epidemiology of *Giardia* and giardiasis. *Veterinary Parasitology* 126, 15-35.
- Thompson, S.S., Jackson, J.L., Suva-Castillo, M., Yanko, W.A., Kuo, J., Chen, C.-L., Williams, F.P., Schnurr, D.P., 2003. Detection of infectious human adenoviruses in tertiary-treated and ultraviolet-disinfected wastewater. *Water Environment Research* 75, 163170.
- Tyzzer, E.E., 1907. A sporozoan found in the peptic glands of the common mouse. *Proceedings of the Society of Experimental Biology and Medicine* 5, 12-13.

- Unfiltered Systems Working Group Comments on LT2SWTR, 2004. Long term 2 enhanced surface water treatment rule, proposed rule, 68, Federal Register 47639, Docket No. OW-2002-0039. United States Environmental Protection Agency (USEPA), p. 10.
- United States Environmental Protection Agency (USEPA), 2010. Long term 2 enhanced surface water treatment rule toolbox guidance manual. Office of Water, Washington, DC, USA, p. 380.
- United States Environmental Protection Agency (USEPA), 2006a. Federal Register. Part II. National primary drinking water regulations: stage 2 disinfectants and disinfection byproducts rule; final rule. Office of Science and Technology, Office of Water, Washington, DC, USA, p. 107.
- United States Environmental Protection Agency (USEPA), 2006c. Ultraviolet disinfection guidance manual for final long term 2 enhanced surface water treatment rule. Office of Water (4601), Washington, DC, USA, p. 436.
- United States Environmental Protection Agency (USEPA), 2005a. Economic analysis for long term 2 enhanced surface water treatment rule. Office of Ground Water and Drinking Water, The Cadmus Group, Inc., Arlington, Virginia, USA, p. 317.
- United States Environmental Protection Agency (USEPA), 2005b. Method 1623: *Cryptosporidium* and *Giardia* in water by filtration/IMS/FA, Washington, DC, USA, p. 76.
- United States Environmental Protection Agency (USEPA), 2005c. Microbial source tracking guide document. Office of Research and Development, Cincinnati, Ohio, USA, p. 133.
- United States Environmental Protection Agency (USEPA), 2005d. National primary drinking water regulation: long term 2 enhanced surface water treatment rule (Final rule), Washington, DC, USA, p. 34.
- United States Environmental Protection Agency (USEPA), 2005e. Occurrence and exposure assessment for the final long term 2 enhanced surface water treatment rule. Office of Water (4606-M), p. 206.
- United States Environmental Protection Agency (USEPA), 1998a. Federal Register. Part V. National primary drinking water regulations: interim enhanced surface water treatment (Final Rule). Office of Science and Technology, Office of Water, Washington, DC, USA, pp. 69478-69521.

- United States Environmental Protection Agency (USEPA), 1998b. National primary drinking water regulations: disinfectants and disinfection by-products; final rule, Washington, DC, pp. 69389-69476.
- United States Environmental Protection Agency (USEPA), 1996. ICR microbial laboratory manual, Washington, DC, USA, p. 233.
- United States Environmental Protection Agency (USEPA), 1989. The surface water treatment rule. Federal Register 54FT27485, Washington, DC, USA.
- Upton, S.J., Tilley, M., Brillhart, D.B., 1995. Effects of select medium supplements on in vitro development of *Cryptosporidium* parvum in HCT-8 cells. Journal of Clinical Microbiology 33, 371-375.
- Van Herk, F.H., McAllister, T.A., Cockwill, C.L., Guselle, N., Larney, F.J., Miller, J.J., Olson, M.E., 2004. Inactivation of Giardia cysts and *Cryptosporidium* oocysts in beef feedlot manure by thermophilic windrow composting. Compost Science and Utilization 12, 235-241.
- Wade, S.E., Mohammed, H.O., Schaaf, S.L., 2000. Prevalence of Giardia sp, *Cryptosporidium* parvum and *Cryptosporidium* muris (C. Andersoni) in 109 dairy herds in five counties of southeastern New York. Veterinary Parasitology 93, 1-11.
- Wallis, P.M., Erlandsen, S.L., Isaac-Renton, J.L., Olson, M.E., Robertson, W.J., van Keulen, H., 1996. Prevalence of Giardia cysts and *Cryptosporidium* oocysts and characterization of Giardia spp. isolated from drinking water in Canada. Applied and Environmental Microbiology 62, 2789-2797.
- Ward, P.I., Deplazes, P., Regli, W., Rinder, H., Mathis, A., 2002. Detection of eight *Cryptosporidium* genotypes in surface and waste waters in Europe. Parasitology 124, 359-368.
- Weir, S.C., Pokorny, N.J., Carreno, R.A., Trevors, J.T., Lee, H., 2001. Improving the rate of infectivity of *Cryptosporidium* parvum oocysts in cell culture using centrifugation. The Journal of Parasitology 87, 1502-1504.
- Wen, Q.X., Tutuka, C., Keegan, A., Jin, B., 2009. Fate of pathogenic microorganisms and indicators in secondary activated sludge wastewater treatment plants. J. Environ. Manage. 90, 1442-1447.

- Wilkerson, V., Mertens, D., Casper, D., 1997. Prediction of excretion of manure and nitrogen by Holstein dairy cattle.
- Wilkes, G., Edge, T., Gannon, V., Jokinen, C., Lyautey, E., Medeiros, D., Neumann, N., Ruecker, N., Topp, E., Lapen, D.R., 2009. Seasonal relationships among indicator bacteria, pathogenic bacteria, *Cryptosporidium* oocysts, giardia cysts, and hydrological indices for surface waters within an agricultural landscape. *Water Research* 43, 2209-2223.
- Wohlsen, T., Bates, J., Gray, B., Aldridge, P., Stewart, S., Williams, M., Katouli, M., 2006. The occurrence of *Cryptosporidium* and Giardia in the Lake Baroon catchment, Queensland, Australia. *Water Supply: Research and Technology-Aqua* 55, 357-366.
- World Health Organization (WHO), 2009. Risk assessment of *Cryptosporidium* in drinking water. Public Health and Environment, Water, Sanitation, Hygiene and Health, Geneva, Switzerland, p. 134.
- World Health Organization (WHO), 2006. Guidelines for drinking water quality. *Cryptosporidium*, p. 138.
- Wu, L., Chen, S.X., Jiang, X.G., Shen, Y.J., Lu, Z.X., Tu, G.H., Fu, X.L., Cao, J.P., 2009. Effect of select medium supplements on in vitro development of *Cryptosporidium andersoni* in HCT-8 cells. *Parasitology research* 105, 1419-1424.
- Xiao, L., Fayer, R., Ryan, U., Upton, S.J., 2004. *Cryptosporidium* taxonomy: recent advances and implications for public health. *Clinical Microbiology Reviews* 17, 72-97.
- Xiao, L., Ryan, U.M., 2004. Cryptosporidiosis: an update in molecular epidemiology. *Current Opinion in Infectious Diseases* 17, 483-490.
- Xiao, L., Alderisio, K., Limor, J., Royer, M., Lal, A.A., 2000. Identification of species and sources of *Cryptosporidium* oocysts in storm waters with a small-subunit rRNA-based diagnostic and genotyping tool. *Applied and Environmental Microbiology* 66, 5492-5498.
- Xiao, L.H., Herd, R.P., 1993. Quantitation of Giardia cysts and *Cryptosporidium* oocysts in fecal samples by direct immunofluorescence assay. *Journal of Clinical Microbiology* 31, 2944-2946.
- Zarlenga, D.S., Trout, J.M., 2004. Concentrating, purifying and detecting waterborne parasites. *Veterinary Parasitology* 126, 195-217.

- Zhou, L., Fayer, R., Trout, J.M., Ryan, U.M., Schaefer III, F.W., Xiao, L., 2004a. Genotypes of *Cryptosporidium* species infecting fur-bearing mammals differ from those of species infecting humans. *Applied and Environmental Microbiology* 70, 7574-7577.
- Zhou, L., Kassa, H., Tischler, M.L., Xiao, L., 2004b. Host-adapted *Cryptosporidium* spp. in Canada Geese (*Branta canadensis*). *Applied and Environmental Microbiology* 70, 4211-4215.